

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**EFFECTO DE GHRELINA SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS  
BOVINO Y SU IMPACTO SOBRE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO  
EMBRIONARIO POSTERIOR**

*Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de*  
**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Autor:** MV, Matías Ángel Sirini

**Directores:** Dra. Cecilia C. Furnus, Dr. Alejandro E. Relling

**Codirector:** Dr. J. Mateo Anchordoquy

Lugar de trabajo: Instituto de Genética Veterinaria Prof. Fernando N. Dulout (IGEVET, UNLP-CONICET). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118 s/n, (CP 1900) La Plata, Buenos Aires, Argentina.

**Miembros del Jurado:**

Dra. Mariana Carriquiry (Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay)

Dr. Pablo Daniel Cética (Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad de Buenos Aires)

Dr. Rodolfo Luzbel de la Sota (Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata)

**La Plata, 2018**

«El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar. Es la fuente de todo arte y ciencia verdadera».

*Albert Einstein*

## **Agradecimientos**

- ❖ A mis directores, la Dra. Cecilia C. Furnus y el Dr. Alejandro E. Relling por ofrecerme la oportunidad de desarrollar este trabajo de tesis bajo su dirección, por la confianza que depositaron en mí y por su apoyo incondicional; por su motivación, dedicación, compromiso e infinita paciencia a lo largo de todo este camino; por compartir sus experiencias y valiosos conocimientos, aportando una visión crítica y constructiva a la tesis y hacer posible su conclusión; y por sobre todo, por su gran calidez humana y su amistad.
- ❖ A mi codirector, el Dr. Mateo Anchordoquy por su gran amistad y su inagotable paciencia; por su valiosa ayuda en cada momento; por todos los consejos y el apoyo en los momentos difíciles de mi vida; por el ser humano que es y por ser una gran fuente de inspiración.
- ❖ Al Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout” (IGEVET) por brindar su espacio y recursos. En especial a la directora del Instituto Dra. Pilar Peral García por brindarme siempre su apoyo y depositar su confianza en mí, pero sobre todo por su calidez humana; a todas y cada una de las personas que hacen al IGEVET y que siempre me han tratado tan amable y cariñosamente, por toda su predisposición, colaboración y asistencia técnica.
- ❖ A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad Nacional de La Plata por brindarme de forma gratuita una formación académica de excelencia y por ceder el espacio físico donde se desarrolló este trabajo.
- ❖ Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios de doctorado.

- ❖ A la Dra. Silvina Quintana y al grupo del laboratorio “Fares Taie” por recibirnos siempre tan cariñosamente; por su permanente buen humor, predisposición, colaboración y asistencia técnica en los ensayos de expresión génica.
- ❖ A los Dres. Guillermo Mattioli y Mauricio Giuliodori por permitirme formar parte del Curso de Fisiología, y así abrirme las puertas a la docencia; por confiar en mí. A Muricio Giuliodori por su constante ayuda y guía en los análisis estadísticos. Al grupo del laboratorio de Minerales, de Nutrición Animal y el Curso de Fisiología; a todas esas maravillosas personas, Diana, Analía, Guadalupe, Ramiro, Elías, Ayelén, Gajo, Velen, Esteban, Raúl, por todo lo que hemos compartido, por acompañarme y ayudarme en todo momento.
- ❖ A mis amigos y compañeros: Mato, Pato, Juan, Malen, Noe, José, Anita; por acompañarme, algunos desde el comienzo y otros a medio camino, en este viaje de cinco años de desafíos, logros y aprendizaje; por hacer de este viaje una aventura; por su ayuda sincera y desinteresada, por su buena vibra y espíritu de grupo; también agradecer especialmente a Gise por su gran paciencia y valiosa ayuda en mis primeros pasos y experiencia en el mundo molecular, por su amistad.
- ❖ A mis amigos de tanto tiempo, Juan, Fran, Martin, Dani, Yani, Nico, y el Vasco, por acompañarme, y entre tantas otras cosas, por compartir esta maravillosa profesión; por todo lo que hemos transitado juntos.
- ❖ A mi querida esposa, compañera de vida y gran maestra Meli; por su amor incondicional.
- ❖ A mis padres Jorge y Susana por todo su amor, apoyo incondicional, infinita confianza, por su invalorable esfuerzo por brindarme todo lo que necesite y acompañarme durante todos estos años; a mis queridos hermanos y compañeros de la vida, Jorgelina, Gonzalo y Rodrigo por todo lo que nos une; al resto de mi gran familia por formar parte.

Todo este trabajo hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que así sea. Todos de alguna u otra forma contribuyeron no solo en mi crecimiento académico y profesional, sino también personal.

¡GRACIAS!

## Publicaciones parciales del presente trabajo de tesis

- Matías A. Sirini, Juan Mateo Anchordoquy, Juan Patricio Anchordoquy, Ana M. Pascua, Noelia Nikoloff, Ana Carranza, Alejandro E. Relling, and Cecilia C. Furnus (2017). The presence of acylated ghrelin during *in vitro* maturation of bovine oocytes induces *cumulus* cell DNA damage and apoptosis, and impairs early embryo development. *Zygote*; 25(5):601-611.
- Matías Ángel Sirini, Juan Patricio Anchordoquy, Silvina Quintana, Cecilia Furnus, Alejandro Enrique Relling and Juan Mateo Anchordoquy. Expression of ghrelin and its receptor mRNA in Bovine Oocytes and Cumulus Cells. *Int J Fertil Steril*, vol 12, number 4, 2018. En prensa.

## Presentaciones a Congresos:

- Sirini, MA; Anchordoquy, JM; Nikoloff, N; Anchordoquy, JP; Pascua, AM; Furnus, CC. Efecto de distintas concentraciones de ghrelina sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos hasta el estadio preimplantacional de blastocisto. Segunda jornada de divulgación científica del IGEVET. CCT CONICET La Plata 19 de diciembre de 2016.
- Sirini, MA; Nikoloff, N; Anchordoquy, JM; Anchordoquy, JP; Pascua, AM; Testa, JA; Furnus, CC. Ghrelina: efecto sobre la maduración *in vitro* de ovocitos bovino y la integridad de las células del *cumulus*. Primeras jornadas de divulgación científica del IGEVET. CCT CONICET La Plata 3 de diciembre de 2015.
- Sirini, MA; Nikoloff, N; Anchordoquy, JM; Anchordoquy, JP; Pascua, AM; Testa, JA; Furnus, CC. Efecto de la suplementación con ghrelina al medio de cultivo sobre la frecuencia de apoptosis de células del *cumulus*. II Congreso Internacional Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. Noviembre 2015.
- Sirini, MA; Nikoloff, N; Anchordoquy, JM; Anchordoquy, JP; Pascua, AM; Testa, JA; Furnus, CC. Evaluación del daño genómico en células de *cumulus* inducido por la hormona ghrelina. II Congreso Internacional Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. Noviembre 2015.

- Sirini M.A., Anchordoquy J.P., Anchordoquy J.M, Pascua A.M., Testa J.A., Furnus C.C. “Efecto de la suplementación de concentraciones de ghrelina similares a un balance energético positivo y negativo sobre la maduración *in- vitro* de ovocitos bovinos”. XI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Pabellón Argentino de la Universidad Nacional de Córdoba, 13,14 y 15 de Agosto de 2015.
- Sirini MA, Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, Barbisan G, Relling AE, Furnus CC “Expression of ghrelin and its receptor in bovine *cumulus*–oocyte complex”. XVI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología. Chascomús, Argentina 1 al 3 de Diciembre de 2014.
- Sirini MA, Anchordoquy JM, Testa JA, Relling AE, Furnus C. Efecto de concentraciones crecientes de ghrelina en el medio de maduración *in vitro* de ovocitos sobre el área de expansión del *cumulus*. I Congreso Internacional de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, 28, 29 y 30 de Noviembre de 2013.
- Sirini MA, Anchordoquy JM, Testa JA, Furnus C, Relling A. “Efecto de la ghrelina sobre la maduración *in vitro* de ovocitos de bovino y su capacidad de desarrollo posterior”. IV Congreso Argentino de Producción Animal, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 19 y 20 de Septiembre de 2013.

# Índice de contenidos

<b>RESUMEN .....</b>	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XVII</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA BOVINA .....	2
BALANCE ENERGÉTICO Y SU IMPACTO EN LA REPRODUCCIÓN .....	21
DESCUBRIMIENTO DE GHRELINA .....	25
<i>Estructura y función .....</i>	<i>27</i>
<i>Síntesis y regulación de la secreción de ghrelina .....</i>	<i>33</i>
<i>GHS-R (Receptor de secretagogos de GH) .....</i>	<i>35</i>
VÍNCULO ENTRE LA NUTRICIÓN, GHRELINA Y LA REPRODUCCIÓN .....	42
OBJETIVO DE LA TESIS.....	45
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>47</b>
<b>DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GHRELINA Y SU RECEPTOR GHS-R1A EN EL COC BOVINO.....</b>	<b>47</b>
INTRODUCCIÓN .....	48
MATERIALES Y MÉTODOS .....	50
RESULTADOS .....	59
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	62
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>67</b>
<b>EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GHRELINA SOBRE LA MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LOS OVOCITOS BOVINOS.....</b>	<b>67</b>



INTRODUCCIÓN .....	68
MATERIAL Y MÉTODOS .....	72
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	78
RESULTADOS .....	80
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	85
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>91</b>
<b>EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GHRELINA SOBRE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO DE LOS</b>	
<b>OVOCITOS HASTA EL ESTADÍO PREIMPLANTACIONAL DE BLASTOCISTO. ....</b>	
<b>91</b>	<b>91</b>
INTRODUCCIÓN .....	92
MATERIAL Y MÉTODOS .....	95
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	98
RESULTADOS .....	100
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	105
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>113</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>113</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>116</b>
<b>APÉNDICE 1 .....</b>	<b>155</b>
<b>TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i> (MEDIOS Y SOLUCIONES).....</b>	<b>155</b>
SOLUCIONES STOCK PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO .....	156
STOCK GHRELINA .....	158
MEDIOS DE CULTIVO .....	159
MEDIO DE MADURACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	161
SOLUCIONES DE PERCOLL PARA SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES.....	161

MEDIO PARA FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i> .....	162
MEDIO PARA CULTIVO DE EMBRIONES <i>IN VITRO</i> .....	163

## Lista de abreviatura

**AEC:** área de expansión del *cumulus*  
**AGNE:** ácidos grasos no esterificados  
**AMPc:** adenosín monofosfato cíclico  
**BE:** balance energético  
**BEN:** balance energético negativo  
**BEP:** balance energético positivo  
**BHB:**  $\beta$ -hidroxibutirato  
**CC:** células del *cumulus*  
**CCK:** colecistoquinina  
**CGP:** células germinales primordiales  
**CIV:** cultivo *in vitro*  
**COC:** complejo ovocito-*cumulus*  
**DAG:** diacilglicerol  
**ERK:** cinasa regulada por señal extracelular  
**FIV:** fertilización *in vitro*  
**FPM:** factor promotor de la maduración  
**FSH:** hormona folículo estimulante  
**gap:** unión estrecha  
**GH:** hormona de crecimiento  
**GHRH:** hormona liberadora de GH  
**GH:** secretagogos de GH  
**GHS-R1a y 1b:** receptor de secretagogos de GH tipo 1a y 1b  
**GOAT:** O-aciltransferasa de ghrelina  
**GPCR:** receptor acoplado a proteínas G  
**GRK:** cinasas de receptores acoplados a proteínas G  
**HDL:** lipoproteínas de alta densidad  
**IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico 1

**PIP<sub>2</sub>:** fosfolípido de inositol bifosfato

**IP<sub>3</sub>:** inositol 1,4,5-trifosfato

**LH:** hormona luteinizante

**MAPK:** proteína cinasa estimulada por mitógenos

**MII:** metafase II

**MIV:** maduración *in vitro*

**NPY:** neuropéptido Y

**PBS:** solución buffer de fosfato

**PI-3 cinasa:** fosfoinositol 3 cinasa

**PIV:** producción *in vitro* de embriones

**PKA:** proteína cinasa A

**PKC:** proteína cinasa C

**PLC:** fosfolipasa C

**pM:** picomolar

**PS:** fosfatidilserina

**RTK:** receptor tirosin cinasa

**SFB:** suero fetal bovino

**T0:** tiempo0/inmaduros

**T24:** 24h de maduración

**VG:** vesícula germinal

## Lista de figuras

	Página
<b>Figura 1.1</b> Relación entre el desarrollo folicular y el desarrollo del ovocito en el bovino.....	4
<b>Figura 1.2</b> Folículos pequeños en ovarios de bovino.....	8
<b>Figura 1.3</b> Ondas de crecimiento folicular durante un ciclo estral en bovinos.....	11
<b>Figura 1.4</b> Imagen de la estructura del folículo dominante donde se observa al ovocito rodeado por células de la granulosa.....	12
<b>Figura 1.5</b> Esquema de la sucesión de eventos que conducen a la ovulación.....	17
<b>Figura 1.6</b> Mecanismo de luteolisis por PGF2 $\alpha$ .....	19
<b>Figura 1.7</b> Variaciones en la duración del ciclo estral bovino.....	20
<b>Figura 1.8</b> Modelo conceptual del mecanismo a través del cual la nutrición afecta la reproducción en vacas postparto.....	25
<b>Figura 1.9</b> Receptor de secretagogos de GH (GH-R) en una célula somatotropa.....	26
<b>Figura 1.10</b> Representación esquemática de la síntesis de pre-proghrelina y los péptidos que se generan a partir de esta secuencia de aminoácidos.....	28
<b>Figura 1.11.</b> Estructura de la ghrelina humana acilada y desacilada.....	29
<b>Figura 1.12</b> Comparación de la estructura primaria de la ghrelina humana y las diferentes especies domésticas.....	32
<b>Figura 1.13</b> Estructuras de la ghrelina humana en comparación a la del bovino.....	32
<b>Figura 1.14</b> Mecanismos propuestos para la acción de ghrelina luego de unirse a su receptor (GHS-R1a).....	41
<b>Figura 2.1</b> Optimización del ensayo de PCR en tiempo real del gen de ghrelina.....	56
<b>Figura 2.2</b> Niveles relativos de expresión del ARNm de ghrelina en ovocitos y CC..	60
<b>Figura 3.1</b> Medición del área de expansión del <i>cumulus</i> . Imagen microscópica (40 X) de un COC antes de la MIV (T0) izquierda y luego de 24 horas de MIV (derecha, <i>cumulus</i> expandido).....	75

<b>Figura 3.2</b> Imagen tomada con microscopio de fluorescencia a 400 aumentos donde pueden observarse las células positivas para anexina V (A), células vivas y anexina V positiva visualizadas en campo claro (B) y células necróticas (IP positivas) (C)....	75
<b>Figura 3.3</b> Clasificación de los Cometas según la longitud de sus colas.....	77
<b>Figura 3.4</b> Efecto de la ghrelina sobre la viabilidad de las células del <i>cumulus</i> después de la MIV.....	83
<b>Figura 4.1</b> Efecto de diferentes concentraciones de ghrelina en el medio de MIV sobre el porcentaje de blastocistos eclosionados ( <i>hatched</i> ) a día 9.....	105

## Lista de tablas

	Página
<b>Tabla 1.1</b> Clasificación de los folículos preantrales en la especie bovina.....	5
<b>Tabla 2.1</b> Primers usados en este estudio, secuencias, temperatura de annealing y longitud del producto de la PCR.....	53
<b>Tabla 2.2</b> Expresión del ARNm de GHS-R1a en ovocitos y CC.....	60
<b>Tabla 2.3</b> Riesgo de presencia de expresión de GHS-R1a en función de la suplementación con ghrelina (suplementado vs no suplementado).....	61
<b>Tabla 3.1</b> Efecto de la ghrelina sobre la maduración <i>in vitro</i> de ovocitos bovinos....	81
<b>Tabla 3.2</b> Efecto de la ghrelina sobre la maduración meiótica de ovocitos madurados <i>in vitro</i> .....	82
<b>Tabla 3.3</b> Análisis de la apoptosis en células del cúmulo (CC) expuestas a diferentes concentraciones de ghrelina medidas por anexina V-FITC / PI.....	84
<b>Tabla 3.4</b> Análisis del daño en el ADN en células del <i>cumulus</i> expuestas a concentraciones crecientes de ghrelina evaluadas mediante ensayo cometa en su versión alcalina.....	85
<b>Tabla 4.1</b> Efecto de ghrelina sobre el porcentaje de formación de pronúcleo en ovocitos madurados <i>in vitro</i> .....	101
<b>Tabla 4.2</b> Capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i> con diferentes concentraciones de ghrelina.....	102
<b>Tabla 4.3</b> Efecto de la presencia de diferentes concentraciones de ghrelina sobre la velocidad de desarrollo de ovocitos bovinos madurados <i>in vitro</i> .....	103
<b>Tabla 4.4</b> Efecto de la presencia de diferentes concentraciones de ghrelina durante la maduración <i>in vitro</i> sobre el número de células por blastocisto.....	104

**EFFECTO DE GHRELINA SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS  
BOVINOS Y SU IMPACTO SOBRE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO  
EMBRIONARIO POSTERIOR**

**Palabras claves:** ovocito bovino, ghrelina, maduración *in vitro*, blastocisto

**RESUMEN**

El presente trabajo de tesis consistió en evaluar el efecto de la hormona ghrelina durante la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos bovinos, y su impacto en el desarrollo embrionario posterior. Para tal fin, se propusieron los siguientes objetivos: 1) Estudiar la presencia de ghrelina y su receptor (GHS-R1a) en el complejo ovocito-*cumulus* (COC) de bovino; 2) Evaluar el efecto de distintas concentraciones de ghrelina (0, 20, 40 y 60 pM) durante la MIV de los ovocitos bovinos; 3) Determinar la capacidad de desarrollo posterior de los ovocitos madurados con ghrelina hasta el estadio preimplantacional de blastocisto y 4) Evaluar la calidad de los embriones obtenidos al final del cultivo. Como modelo experimental se utilizó la técnica de Producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos. La PIV se realizó con ovocitos obtenidos a partir de ovarios de frigorífico. Los resultados mostraron que: 1) tanto la ghrelina como su receptor se expresan en los ovocitos y en las células del *cumulus* (CC) del bovino, 2) el agregado de ghrelina aumentó la tasa de apoptosis, el daño en el ADN y disminuyó la viabilidad de las CC, mientras que no modificó el grado de expansión del *cumulus*, 3) el agregado de ghrelina disminuyó la tasa de formación de pronúcleos y blastocistos y, 4) la presencia de ghrelina durante la MIV disminuyó la calidad de los embriones. En conclusión, la expresión de ghrelina y su receptor en el COC bovino pone de manifiesto un efecto local de esta hormona en la función ovárica. Además, la acción de ghrelina durante la MIV evidenció un efecto negativo sobre el desarrollo embrionario temprano.



## **EFFECT OF GHRELIN ON CATTLE OOCYTES MATURATION AND ITS IMPACT ON SUBSEQUENT EMBRYO DEVELOPMENT**

**Key words:** bovine oocyte, ghrelin, *in vitro* maturation, blastocyst

### **ABSTRACT**

This study was conducted to evaluate the effect of ghrelin hormone during *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes, and its impact on subsequent embryo development. The objectives proposed in this doctoral dissertation were to: 1) study the presence of ghrelin and its receptor (GHS-R1a) in bovine oocyte-*cumulus* complex (COC); 2) evaluate the effect of different ghrelin concentrations (0, 20, 40 and 60 pM) during IVM; 3) determine the influence of ghrelin during IVM on subsequent embryo development up to blastocyst stage; and 4) evaluate blastocyst quality at the end of *in vitro* culture. *In vitro* production (IVP) of bovine embryos was used as experimental model, and oocytes were obtained from ovaries of slaughterhouse. The results obtained demonstrated that: 1) both, ghrelin and its receptor, were expressed in oocytes and bovine *cumulus* cells (CC); 2) ghrelin in IVM medium increased the rate of apoptosis, DNA damage and decreased viability in CC but not *cumulus* expansion; (3) the addition of ghrelin to IVM media reduced pronuclei and blastocysts rates; and (4) presence of ghrelin during IVM decreased embryo quality. In conclusion, expression of ghrelin and its receptor in bovine COC reveals a local effect of this hormone on ovarian function. In addition, the action of ghrelin during IVM evidenced a negative effect on early embryo development.

# **Capítulo 1**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## **Fisiología Reproductiva de la Hembra bovina**

### **Ovogénesis y desarrollo folicular**

La ovogénesis es el proceso por el cual se forman las gametas femeninas, encargadas de aportar el complemento haploide de cromosomas que junto con el del espermatozoide darán origen a un nuevo individuo. En los mamíferos, la ovogénesis comienza relativamente temprano, durante el desarrollo del feto, y termina meses o años mas tarde en el momento de la madurez sexual del adulto (Aerts y Bols, 2010a; 2010b). La ovogénesis se inicia con la formación de las células germinales primordiales, que sufren una serie de transformaciones celulares hasta llegar al estadio de ovocito (Fair, 2010).

### **Células germinales primordiales (CGP)**

Los ovocitos se forman a partir de un pequeño número de células germinales primordiales (CGP) de origen extragonadal (Aerts y Bols, 2010a). La aparición de las CGP durante el desarrollo embrionario se produce antes de la formación de los somitos e indica el comienzo de la ovogénesis (Fortune y col., 2010). Las CGP se encuentran en el saco vitelino y luego migran hacia las crestas genitales entre los 30 y 64 días del desarrollo atraídas por factores quimiotácticos (Oktem y Oktay, 2008).

Existen evidencias *in vitro* que sugieren que el esbozo de las gónadas secreta una proteína difusible del tipo TGF- $\beta$ 1 (factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1) que es capaz de atraer a estas células en su ruta hacia las gónadas (Godin y Wyle, 1991). Anderson y colaboradores en 1999, postularon la existencia de otra sustancia quimiotáctica denominada integrina  $\beta$ 1 (receptor de la fibronectina presente en la matriz extracelular), al observar que las CGP que no expresaban esta integrina mostraban fallas en la migración y posterior colonización gonadal. Durante la migración, las CGP se multiplican por división

mitótica llegando a un número que supera los 2 millones de células. Este número disminuye por apoptosis a algo más de 100.000 células antes del nacimiento (Aerts y Bols, 2010a).

## **Etapas de la Ovogénesis**

### **a) Proliferación**

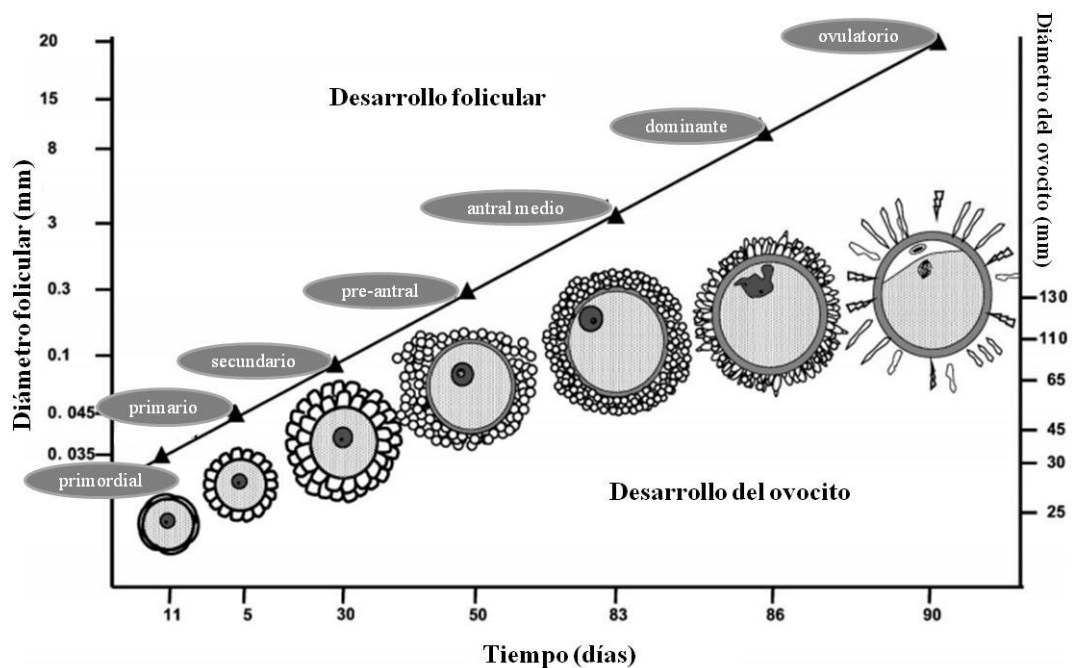
Luego de alcanzar la superficie del epitelio de las gónadas, las CGP migran hacia la corteza del ovario donde, junto con las células epiteliales, dan origen a los cordones sexuales corticales (van den Hurk y Zhao, 2005; De Felici y col., 2005). En el ovario, las divisiones mitóticas de las CGP resultan en la formación de grupos de ovogonias, que se encuentran conectadas entre sí por medio de puentes citoplasmáticos intercelulares (Pepling y Spradling, 1998). Cuando la formación de estos grupos se completa, el ovario queda formado por unas pocas células germinales individuales y numerosos sincitios de células germinales primordiales llamados “células germinales en nido” (*Nest Germ Cells*). Antes del nacimiento, estos grupos celulares comienzan a separarse para formar los folículos individuales (Chen y col., 2007; Tingen y col., 2009; Kimura y col., 2011). El número total de ovogonias que tiene cada individuo ya está fijado antes de la madurez sexual y en algunos casos antes del nacimiento (Yang y Fortune, 2008). Actualmente se cree que el número de divisiones mitóticas que sufre una ovogonia antes de entrar en la fase de crecimiento es fijo para cada especie (Fair, 2003).

### **b) Formación del folículo primordial**

Las ovogonias se diferencian a ovocitos primarios, que se caracterizan por permanecer detenidos en la profase de la primera división meiótica (Aertsy Bolt, 2010a).

Estos ovocitos, rodeados por una única capa de células epiteliales aplanadas denominadas células foliculares, forman los folículos primordiales que están ubicados superficialmente en la corteza del ovario, constituyendo la reserva de folículos que permanecerá durante toda la vida reproductiva del individuo. En la hembra bovina los folículos primordiales están presentes desde los 90 días de desarrollo (Yang y Fortune, 2008).

Durante el desarrollo folicular, los folículos se clasifican en primordiales, primarios, secundarios o preantrales, y terciarios o antrales (Fair, 2003, Figura 1.1). Una clasificación más específica para bovinos sugiere la subdivisión de los folículos preantrales en dos tipos (Braw-Tal y Yossefi, 1997; Tabla 1.1).



**Figura 1.1** Relación entre el desarrollo folicular y el desarrollo del ovocito en el bovino. Se muestra esquemáticamente el crecimiento de los ovocitos (rodeados por células de la granulosa) en relación con el diámetro del folículo, y la duración estimada de la foliculogénesis desde la fase primordial hasta la fase preovulatoria (modificada de Fair, 2003).

Los ovocitos primarios permanecen detenidos en diplonema tardío o difuso (también llamado estadio de diacinesis) hasta que el folículo completa la atresia folicular o, hasta que complete su crecimiento en respuesta al pico de LH. Este pico induce la reanudación de la meiosis convirtiendo al ovocito primario en una gameta haploide (van den Hurk y Zhao, 2005).

**Tabla 1.1** Clasificación de los folículos preantrales en la especie bovina.

Folículo (Tipo)	Capas de CG	n° CG	Folículo (μm)	Ovocito	Presencia de zona pelúcida	Teca interna definida
<b>Primordial (1)</b>	1	< 10 (planas)	< 4	29 ± 0,3	-	-
<b>Primario (2)</b>	1 – 1,5	10-40 (cúbicas)	40-80	31 ± 0,4	-	-
<b>Pre-antral pequeño (3)</b>	2 – 3	41-100	81-130	49,5 ± 2,4	-	±
<b>Pre-antral grande (4)</b>	4 – 6	101-250	131-250	68,6 ± 2,8	+	+
<b>Antral pequeño (5)</b>	> 6	>052	250-500	92,9 ± 4,5	++	++

El número de capas de células de la granulosa (CG) fue tomado en el folículo más grande, cuando el núcleo del ovocito estaba presente. (Modificado de Braw-Tal y Yossefi, 1997).

La mayoría de las hembras de mamífero pierden la capacidad de renovación de las células germinales durante la vida fetal, quedando fijada la reserva de células germinales al momento del nacimiento. Sin embargo, estudios realizados en primates adultos (Bukovsky y col., 2004) y en ratones (Johnson y col., 2004) demostraron que los ovarios de estas especies poseían células germinales mitóticamente activas capaces de formar ovocitos y folículos. Además, Bukovsky y col. (2004) observaron que los componentes de los folículos primordiales (células germinales y células de la granulosa primitiva) pueden

diferenciarse a partir de células progenitoras mesenquimáticas presentes en la túnica albugínea de ovarios de mujeres adultas.

### c) Crecimiento: Folículos preantrales

Los folículos primordiales se convierten en folículos primarios tras la hipertrofia de las células planas que rodean al ovocito, y que se transforman en células cúbicas. A partir de este momento, el folículo comienza a crecer en un proceso continuo que está regulado por el ovario. El ovocito y las células foliculares que lo rodean, crecen coordinadamente progresando a través de una serie de estadios morfológicos definidos, que culminan en la ovulación de un ovocito maduro o en la atresia folicular (Moniruzzaman y Miyano, 2010).

El ingreso de los folículos primordiales a la fase de crecimiento ocurre por ciclos a ritmos relativamente constantes, es decir que periódicamente un grupo de folículos inicia esta etapa. Existe un balance entre los factores estimuladores e inhibidores de origen sistémico y local, que influyen sobre el número de folículos primordiales que comienzan a crecer en cada ciclo y que son independientes de la acción directa de la hormona FSH (Méduri y col., 2002; van den Hurk y Zhao, 2005; Tingen y col., 2009; Moniruzzaman y Miyano, 2010). Durante esta fase de crecimiento, el ovocito permanece detenido en diplonema de la primera profase meiótica e incrementa su volumen. La cantidad de citoplasma aumenta por acumulación de sustancias de reserva, produciéndose un incremento en la síntesis de ARN. Además, aumenta el número de mitocondrias que elevan el consumo de oxígeno, se forman los gránulos corticales que se ubican por debajo de la membrana plasmática, aumenta la síntesis de mucopolisacáridos y enzimas proteolíticas y aparece la zona pelúcida (Aerts y Bols, 2010a). Esta última, está constituida por glicoproteínas como la ZP I a IV que son esenciales para mantener la esfericidad del

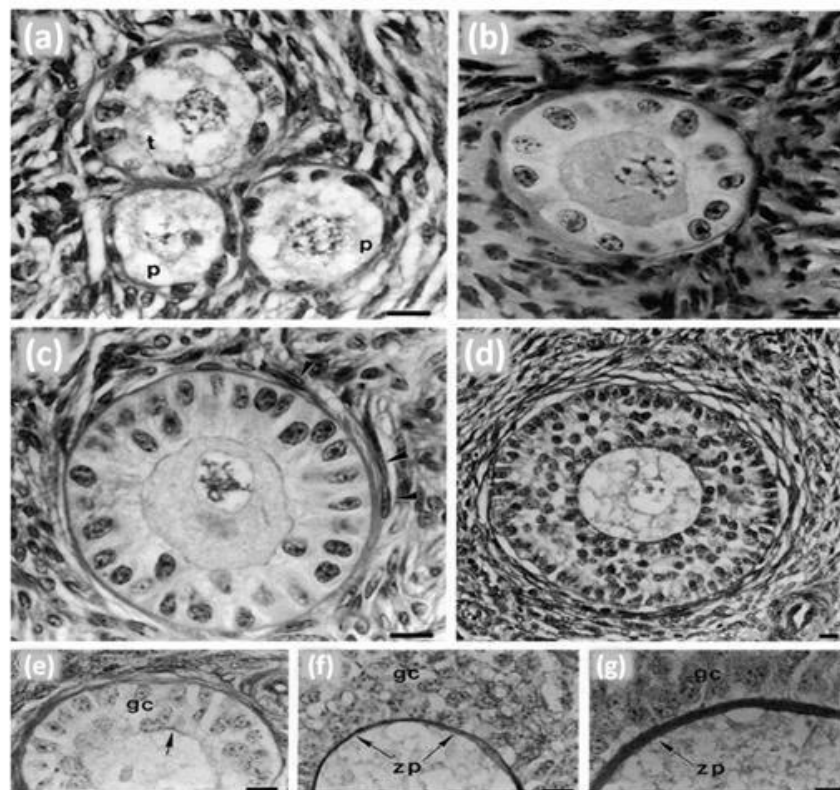
ovocito, permitir la fijación del espermatozoide y generar la reacción acrosómica (Gupta y col., 2011).

La capa de células foliculares cúbicas del folículo primario se estratifica por una serie de divisiones mitóticas pasando a constituir las células de la granulosa. De esta manera queda formado el folículo preantral o folículo secundario (Young y McNeilly, 2010). Tanto los estrógenos como la FSH estimulan la proliferación de las células de la granulosa ejerciendo un efecto mitogénico sobre las mismas (Shimizu y col., 2007). Estas células, además de comunicarse entre sí, presentan uniones *gap* con el ovocito (Gilchrist y col., 2004). Estas uniones están formadas por proteínas llamadas conexinas, como la conexina-37 que se expresa en el ovocito a lo largo de todos los estadios de la foliculogénesis (Borowczyk y col., 2006). Este tipo de uniones se encuentran en muchos sistemas biológicos y actúan como mediadores de la comunicación intercelular, permitiendo el pasaje de pequeñas moléculas que influyen sobre las células vecinas, incluyendo nutrientes, precursores metabólicos como aminoácidos y nucleótidos, hormonas y factores de crecimiento (van den Hurk y Zhao, 2005). El ovocito estimula y controla el desarrollo de las células de la granulosa a través de las uniones *gap* y de una regulación de tipo parácrina (Gilchrist y col., 2004).

Las células tecales derivan del estroma intersticial del ovario y están presentes como células individuales en la lámina basal de los folículos primarios (Hirshfield 1991). Las primeras células de la teca interna pueden ser identificadas en folículos preantrales pequeños o Tipo 3. Sin embargo, la teca interna no se desarrolla claramente hasta el estadio preantral grande o Tipo 4 (Tabla 1.1; Figura 1.2). La capa externa de la teca está densamente vascularizada y provee factores endócrinos al folículo (Tajima y col., 2006; Rodgers y Irving-Rodgers, 2010).



Los folículos multilaminares pueden desarrollar hacia el próximo estadio (antral) en presencia de receptores de FSH defectuosos o, con una mínima circulación de FSH ya que son muy sensibles a las gonadotrofinas (McGee y Hueh, 2000). El crecimiento de los folículos preantrales es independiente de la acción directa de las gonadotrofinas y se encuentra regulado por factores autocrinos y paracrinos, dentro de los cuales, los factores de crecimiento GDF9 y BMP15 secretados por el ovocito serían esenciales (Rajkovic y col., 2006).



**Figura 1.2** Folículos pequeños en ovarios de bovino. (a) Dos folículos primordiales (Tipo 1, p) con una capa de células planas de la granulosa y un folículo transitorio (Tipo 1+, t), con una mezcla de células aplanadas y cúbicas. (b) Folículo primario (Tipo 2: ovocito rodeado de una capa simple de células cúbicas. (c) Folículo preantral primario (Tipo 3); el ovocito comenzó su crecimiento y está rodeado de dos capas de células de la granulosa. El inicio en la formación de la teca puede ser reconocido por la presencia de células elongadas (flecha), pegadas a la membrana basal. (d) Folículo preantral grande (Tipo 4); el ovocito continúa creciendo y está rodeado por cinco capas de células de la granulosa,

mientras que la teca interna está poco definida. (e-g) Formación de la zona pelúcida en folículos de bovinos; (gc) células de la granulosa. (e) Pequeño folículo preantral con una isla de material PAS positivo (flecha). (f) Folículo preantral grande con zona pelúcida (zp) formando un anillo completo alrededor del ovocito (flecha). (g) Folículo antral con una gruesa zona pelúcida (flecha). (a-d) Tinción con hematoxilina-eosina; (e-g) Reacción de PAS. La barra de la escala representa 10  $\mu\text{m}$  (Braw-Tal y Yossef, 1997).

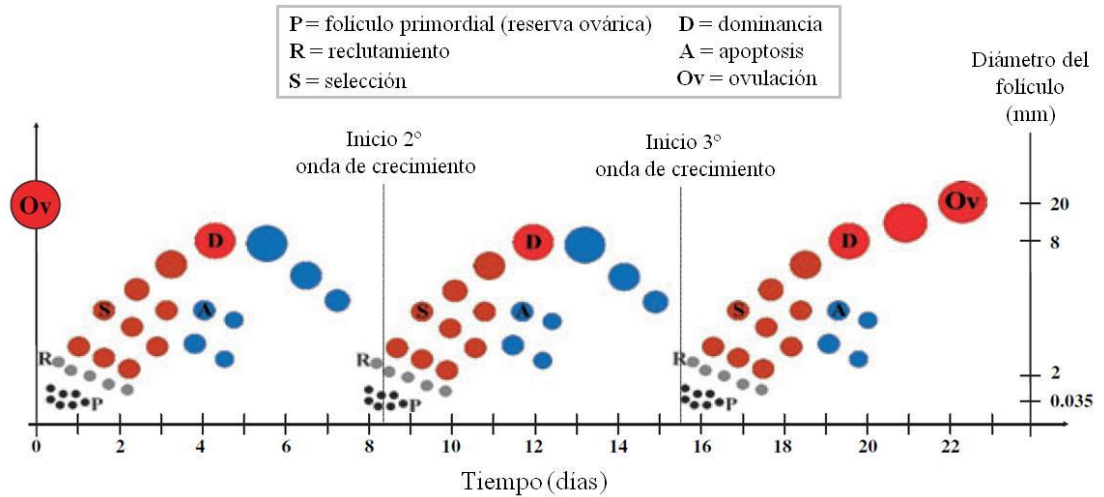
#### d) Maduración

##### **Folículos antrales**

El fluido antral comienza a formarse cuando el folículo posee más de 250 células de la granulosa que al principio son pequeñas acumulaciones y luego coalescen formando el antro folicular (Smitz y Cortvrindt, 2002). Se sabe que el antro folicular se forma por la presión osmótica que generan proteoglicanos sintetizados por las células de la granulosa, los que atraen agua por las vías paracelular y transcelular desde los vasos tecaes (Rodgers y Irving-Rodgers, 2010). El fluido folicular es una importante fuente de sustancias regulatorias y moduladoras derivadas de la sangre, como hormonas, factores de crecimiento, enzimas, proteoglicanos y lipoproteínas (van den Hurk y Zhao, 2005). La señal que dispara la formación del antro folicular permanece poco clara hasta el momento. Estudios *in vitro* realizados en roedores, muestran como posibles candidatos a la FSH (Hartshorne, 1997; Mao y col., 2002), a la LH (Cortvrindt y col., 1998), a la activina (Zhao y col., 2001) y al ligando K (Driancourt y col., 2000).

En el desarrollo folicular se distinguen una etapa inicial, independiente de la estimulación de las gonadotrofinas, y una segunda etapa dependiente de las mismas (Forde y col., 2011). En la etapa de crecimiento inicial los folículos antrales tempranos presentan ARNm para receptores de FSH. Sin embargo, estos folículos son relativamente independientes de las gonadotrofinas ya que aumentan su tamaño en presencia de muy

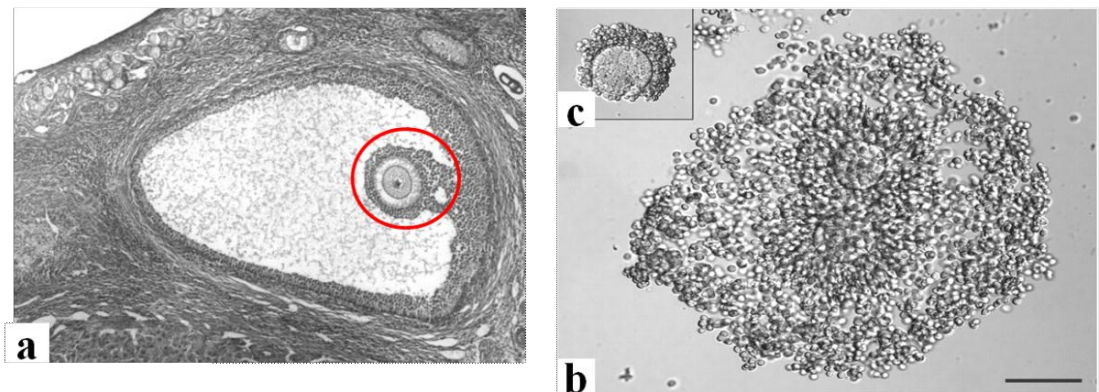
bajas concentraciones de FSH y LH e incluso, lo hacen en ausencia de las mismas (van den Hurk y Zhao, 2005). Cuando los folículos antrales alcanzan un tamaño de aproximadamente 4 a 5 mm en la hembra bovina, se vuelven dependientes de gonadotrofinas y son reclutados para continuar su crecimiento (Driancourt, 2001). El número de folículos reclutados varía entre las especies siendo de 5 a 20 en bovinos (Forde y col., 2011). El reclutamiento y la selección de folículos antrales ocurren en forma de ondas, con 2 a 3 ondas foliculares por ciclo estral, la última de las cuales llega a la ovulación (Figura 1.3). Una señal hormonal selecciona un grupo de folículos que continúan su crecimiento. En esta selección intervienen las hormonas FSH, LH y los estrógenos. La FSH estimula el crecimiento de los folículos por proliferación de las células foliculares. Cuando los folículos superan los 8 mm en vacas, comienzan a desarrollarse receptores de LH en las células de la granulosa y reciben el nombre de dominantes (Driancourt, 2001). Estos folículos sometidos a la acción de la LH crecerán rápidamente en pocos días y se volverán más grandes que el resto para formar el folículo dominante. En estos folículos dominantes, el ovocito se encuentra rodeado muy estrechamente por células de la granulosa conocidas como células del *cumulus* (*cumulus oophorus*), formando junto con el ovocito al cual rodean un complejo muy compacto llamado complejo ovocito - *cumulus* (COC).



**Figura 1.3** Ondas de crecimiento folicular durante un ciclo estral en bovinos. Cada onda de crecimiento folicular incluye una etapa de reclutamiento (R) de folículos primordiales de reserva (P), seguido de una etapa de selección de uno de ellos (S), mientras el resto se atrofia (A), y finalmente una etapa de dominancia (D) (modificado de Aerts y Bols, 2010b).

Este complejo es una estructura embebida en líquido folicular y conectado con las células de la granulosa murales que rodean el antro folicular (Eppig y col., 2002; Figura 1.4). La dominancia folicular se encuentra reforzada por al menos dos factores locales, el IGF-I que estimula la formación de receptores para LH (Chase y col., 1998) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), un potente promotor de la angiogénesis derivado de la teca, cuya producción se encuentra estimulada por la LH (Garrido y col., 1993). La LH que llega a las células foliculares estimula la producción de altos niveles de estrógenos, que mediante un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo e hipófisis, inhiben la producción de FSH, privando a los folículos menos desarrollados de la cantidad de hormona necesaria para comenzar o completar el proceso de crecimiento (Zelevnik, 1981). Se cree que esta inhibición disminuye la actividad de la enzima aromatasa, que es dependiente de FSH. Esta falta de estrógenos en los folículos

menos maduros impide completar su desarrollo por lo que estarían destinados a la atresia (Aerts y Bols, 2010b). Cuando se forma el antro, el ovocito finaliza su crecimiento y está en condiciones de reanudar la meiosis (Mattson y Albertini, 1990; Wickramasinghe y col., 1991). Las células de la granulosa poseen entonces un gradiente en el número de receptores para LH, siendo mucho más abundantes en las células próximas a la membrana basal que en las que están más alejadas de ella.



**Figura 1.4** Imagen de la estructura del folículo dominante donde se observa el ovocito rodeado por las células de la granulosa (a). Complejos ovocitos *cumulus* (COC) (b y c); obsérvese la diferencia en la expansión de las células del *cumulus* de COC madurados *in vitro* con estimulación de FSH (b) y sin la misma (c). La barra de la escala representa 100  $\mu\text{m}$  (Eppig y col., 2002).

### **Maduración nuclear o meiótica**

Durante el período comprendido entre el pico de LH y la ovulación, el ovocito sufre una serie de cambios en su núcleo y en su citoplasma, proceso al que se denomina maduración del ovocito. En el mismo ocurre redistribución de organelas celulares, migración de mitocondrias a una posición perinuclear y acumulación de los gránulos corticales a lo largo del oolema (van den Hurk y Zhao, 2005).

El progreso del ovocito desde el estadio de profase I (P-I) hasta el de metafase II (M-II) se denomina maduración meiótica. Este proceso se lleva a cabo en aproximadamente 24 h en rumiantes y se caracteriza por un fuerte incremento en la síntesis de proteínas durante el período de ruptura de la membrana nuclear o vesícula germinal (VG; van den Hurk y Zhao, 2005). Las proteínas deben ser sintetizadas a partir de un *pool* de ARNm ya presente, ya que no se puede realizar la transcripción *de novo* en este momento del ciclo. Por lo tanto, la regulación de la expresión génica en esta etapa del desarrollo está regulada a nivel de la traducción del ARNm previamente sintetizado (Wrenzycki y col., 2007).

La maduración o competencia meiótica se caracteriza por la disolución de la membrana nuclear, la condensación de la cromatina formando cromosomas bivalentes distinguibles, la separación de los cromosomas homólogos, la emisión del primer cuerpo polar, y la detención en M II con los cromosomas alineados en el huso acromático. Los ovocitos ovulados completan la meiosis con la separación de las cromátidas y la emisión del segundo cuerpo polar (segunda división reduccional) en el momento de la fecundación. Este proceso es inducido por la penetración del espermatozoide (Fan y Sun, 2004). La meiosis *in vivo* se inicia por el estímulo hormonal generado por la oleada de LH, pero en condiciones *in vitro* el proceso meiótico continúa, aún en medios carentes de LH (Hashimoto y col., 2002; Hashimoto, 2009).

Entre las múltiples moléculas que regulan la maduración del ovocito, se ha señalado como una de las más importantes al factor promotor de la maduración (FPM), que desempeña un papel clave en la ruptura de la VG (Liang y col., 2007). Posteriormente se determinó que el FPM participa tanto en la división meiótica como en la mitótica, por lo que actualmente se lo considera el regulador universal del ciclo celular o factor promotor de metafase (Han y Conti, 2006).

Los sustratos sobre los cuales actúa el FPM, son: a) la histona H1 cuya fosforilación interviene en la condensación de los cromosomas; b) las láminas que forman una malla fibrilar sobre la cara interna de la membrana nuclear y cuya fosforilación provoca la despolimerización y consiguiente ruptura de la membrana al final de la profase y c) la nucleolina (N° 38 o B23) que al ser fosforilada por el FPM provoca el desensamblaje del nucléolo durante la división celular (Perry y Verlhac, 2008). El FPM, además regula la duración de las fases del ciclo celular durante la meiosis y controla los eventos para la formación de un huso meiótico funcional y la posterior división celular (Brunet y Maro, 2005).

El FPM es un heterodímero compuesto de una subunidad reguladora llamada ciclina B1 y una subunidad pequeña, catalítica llamada p34 (Liang y col., 2007; Solc y col., 2010). Esta última, también conocida como cinasa dependiente de ciclina (CDK) 1, es una proteína cinasa (serina-treonina) de 34.000 Daltons que fue descubierta en levaduras y que es codificada por el gen *cdc 2* perteneciente al grupo de genes *cdc* que controlan la división celular (Nurse, 1990).

El FPM se activa en el momento de la ruptura de la VG y aumenta hasta alcanzar una meseta al final de la meiosis I. Una disminución transitoria de la actividad se lleva a cabo durante la transición desde la meiosis I a la meiosis II, para luego reactivarse rápidamente y mantenerse en un nivel alto durante toda la detención en M II (Brunet y Maro, 2005). La actividad del FPM es controlada por la concentración celular de ciclina B, que se encuentra determinada por su síntesis y degradación. Esta ciclina entra en la VG justo antes de su ruptura (Marangos y Carroll, 2004). Luego de la misma, su síntesis aumenta progresivamente alcanzando su máximo nivel al final de la meiosis I. La ciclina sintetizada se asocia con la subunidad p34 para formar el complejo activo. La degradación de ciclina

B es necesaria para la expulsión del cuerpo polar (Ledan y col., 2001; Herbert y col., 2003; Terret y col., 2003).

Luego de la ruptura de la vesícula germinal aparece un factor citostático (FCS) que controla la detención en M II y alcanza su concentración máxima cuando el ovocito llega a esta etapa (Perry y Verlhac, 2008). El FCS está constituido por una fosfoproteína de 39000 Daltons (p39), producto del gen c-mos y por una cinasa 2 que es producto del gen cdk 2 dependiente de ciclina, que es muy sensible a los iones calcio y actúa inhibiendo la proteólisis de la ciclina (Watanabe y col., 1991; Gabrielli y col., 1993). Mientras la ciclina no es degradada, el FPM permanece activo. Otra proteína cinasa importante en la regulación del ciclo celular meiótico es la MAP cinasa (MAPK), la cual fosforila proteínas cromosómicas importantes para mantener a la cromatina en un estado condensado durante la transición de meiosis I a meiosis II y prevenir la formación de la envoltura nuclear por la fosforilación de las láminas nucleares (Gil Villa y col., 2007).

### **Regulación hormonal de la maduración en mamíferos**

Durante la fase de crecimiento del ovocito, la hipófisis secreta cantidades crecientes de FSH que estimula la proliferación de las células de la granulosa y la formación de nuevos receptores para LH sobre la superficie de las mismas. Poco después del período de crecimiento inicial del folículo, la hipófisis comienza a secretar LH (hormona responsable de iniciar la maduración del ovocito). Las hormonas LH y FSH inducen a las células de la granulosa a sintetizar y liberar cantidades crecientes de estrógenos. El estradiol induce la síntesis de receptores de LH en las células de la granulosa, estimula su crecimiento, mantiene los receptores de FSH, eleva la actividad de la aromatasa con el subsecuente aumento en la producción de estradiol e inhibe la secreción hipofisaria de FSH.



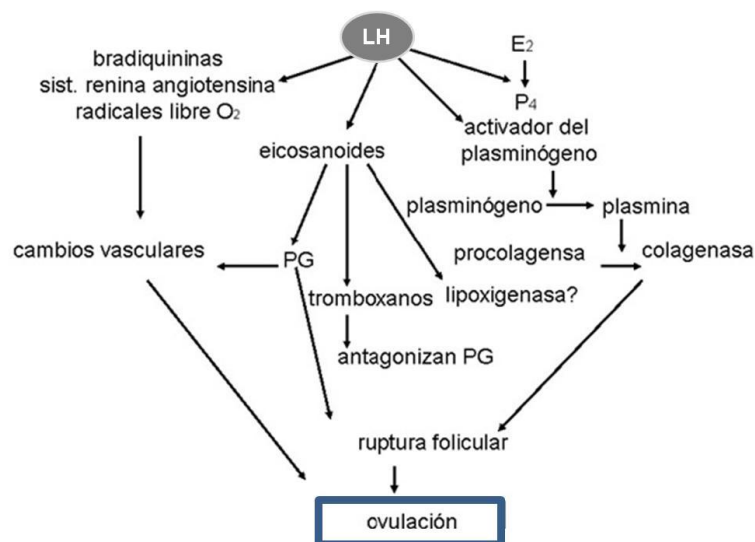
Cuando los estrógenos circulantes se elevan, debido al crecimiento folicular, la secreción de FSH disminuye mientras que la de LH aumenta. El pico de LH se produce por estímulo de GnRH (hormona liberadora de gonadotrofinas) liberada por el hipotálamo en respuesta al estradiol. Los folículos preovulatorios expresan en las células de la granulosa gran cantidad de receptores de LH, que les permite responder a este pico iniciando una cascada de acontecimientos que conducen a la reanudación meiótica de los ovocitos, la expansión del *cumulus*, la ruptura del folículo, la ovulación y finalmente la diferenciación de las células granulosas y tecaes para formar el CL (Edson y col., 2009).

## **Ovulación**

Al final de la fase folicular, cuando los niveles de estradiol alcanzan su valor máximo, se produce un cambio en el efecto que esta hormona ejerce a nivel hipotalámico. La potente retroalimentación negativa del estradiol cambia a positiva a través de un mecanismo que aún permanece poco comprendido. Esto causa un aumento continuo en la liberación de GnRH (pico de GnRH), que junto con un aumento de la capacidad de respuesta gonadotrófica al factor de liberación, provoca el pico preovulatorio de LH (Rutter y Russo, 2002).

La ovulación ocurre durante el estro en todas las especies domesticas con excepción del bovino, que lo hace durante el metaestro (Forde y col., 2011). La ovulación espontánea en el bovino ocurre entre las 10 y 20 horas posteriores a la terminación del celo y es desencadenada por el pico preovulatorio de LH, que provoca como primer evento un aumento del flujo sanguíneo en el folículo ovulatorio, mediado por agentes vasoactivos tales como histamina, quininas, prostaglandinas y lipooxigenasas. Posteriormente se edematizan las tecas interna y externa, se disocia el COC, se

interrumpe la inhibición de la meiosis y se elimina el primer corpúsculo polar. A medida que el folículo avanza en su desarrollo hacia la ovulación se produce una reacción inflamatoria aguda controlada. Aumenta la despolarización de las células foliculares, se generan potenciales de acción y cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico, que contribuyen a la desintegración de tejido intacto de la superficie del ovario. Este proceso de degradación del tejido conectivo que separa el folículo de la superficie ovárica inicia la formación del estigma, área extremadamente delgada del ápice folicular. La  $\text{PGE}_2$  estimula al activador del plasminógeno que transforma el plasminógeno en plasmina. Ésta última es la encargada de activar la collagenasa que lisa el tejido conectivo del estroma ovárico. La  $\text{PGF}_2\alpha$  provoca la ruptura de los lisosomas con la consecuente liberación de las enzimas contenidas en su interior, las que sumadas a la actividad de la plasmina, culminan con la formación del estigma. La  $\text{PGF}_2\alpha$ , también produce contracciones ováricas que provocan la ruptura del folículo y finalmente la liberación del ovocito rodeado por su *cumulus* (Palma, 2001) (Figura 1.5).



**Figura 1.5** Esquema de la sucesión de eventos que conducen a la ovulación (Gigli y col., 2006).

## **Fase luteal del ciclo estral**

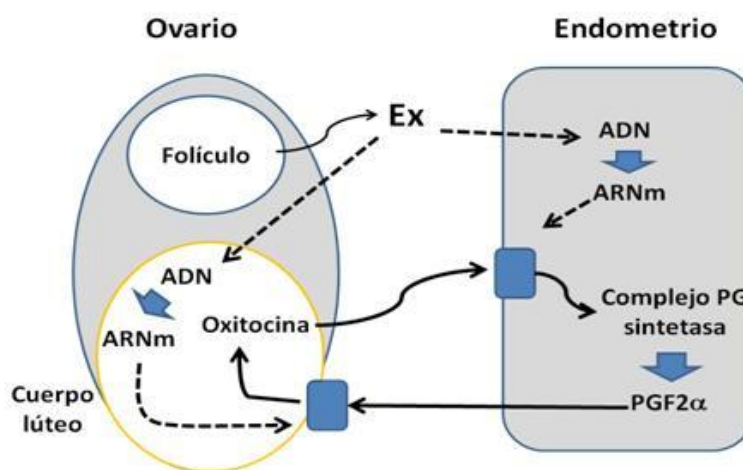
Finalizada la ovulación, los restos del folículo vacío pasan a luteinizarse por acción de la LH, formando primero un cuerpo hemorrágico que luego evoluciona a un cuerpo lúteo maduro (Forde y col., 2011). Estas estructuras son las encargadas de mantener elevados los niveles de P4 en plasma, inhibiendo la secreción hipotalámica de GnRH, lo cual hace que las ondas de crecimiento folicular durante esta fase conduzcan a la atresia y no lleguen a ovular. Esta etapa culmina con la luteólisis a cargo de la  $\text{PGF2}\alpha$  endometrial en caso de que no exista concepción (Krzymowski y Stefańczyk-Krzymowska, 2008) (Figura 1.6).

Si el cuerpo lúteo permanece, queda conformado por dos tipos celulares productores de P4, las células pequeñas (20  $\mu\text{m}$ ), derivadas de la teca interna, que producen bajos niveles de P4 pero responden a LH, y las células grandes (25 a 40  $\mu\text{m}$ ), derivadas de la granulosa y que producen la mayor parte de la P4 y de manera constitutiva (sin estímulo hormonal), siendo además responsables de producir oxitocina (Rutter y Russo, 2002).

A mitad de la fase luteal, la elevada y sostenida concentración de P4 inhibe la expresión de sus propios receptores en la superficie luminal del endometrio, y comienzan los cambios que conducen a la receptividad uterina (Forde y col., 2009).

La luteólisis sobreviene el día 16 del ciclo si no existe un reconocimiento materno de la preñez (Forde y col., 2011). La efectividad de la  $\text{PGF2}\alpha$  como factor luteolítico no depende sólo de sus mecanismos de acción, sino también de una secreción creciente estimulada por un mecanismo de feedback positivo desde el propio cuerpo lúteo, y que se detendrá sólo cuando este último se haya inactivado. Este feedback es iniciado por la oxitocina hipofisaria que estimula la síntesis de  $\text{PGF2}\alpha$  en el endometrio, la cual sale a

circulación y estimula la secreción de oxitocina luteal, iniciando la retroalimentación positiva. Este sistema propuesto logra funcionar sólo si los estrógenos generados en los folículos reclutados en la fase luteal estimulan la expresión de los receptores para la oxitocina en el endometrio y para la  $\text{PGF2}\alpha$  en las células luteales (Figura 1.6).

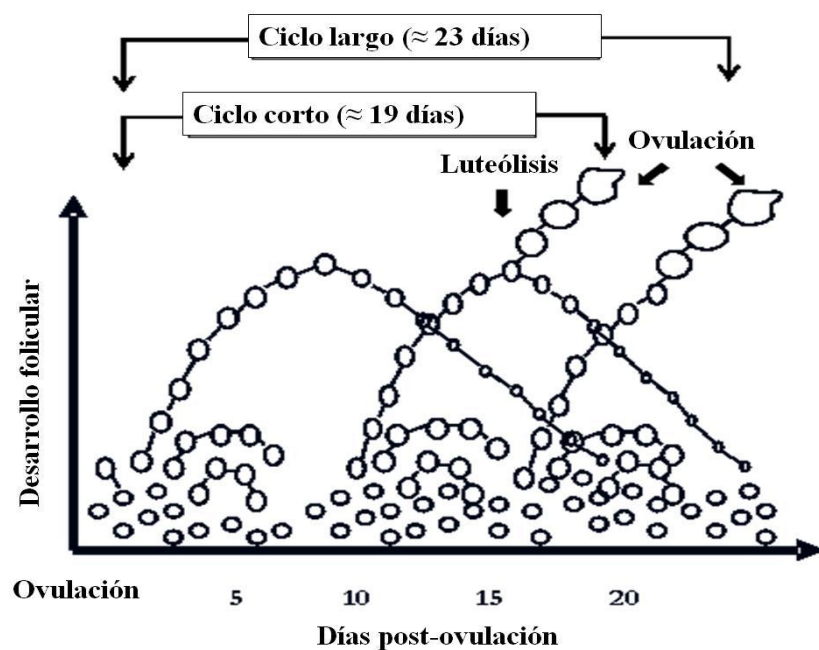


**Figura 1.6** Mecanismo de luteólisis por  $\text{PGF2}\alpha$ . La oxitocina del cuerpo lúteo estimula la secreción de  $\text{PGF2}\alpha$  y ésta a su vez la de nueva oxitocina (feedback positivo). Los receptores para ambas hormonas dependen de estrógenos originados en los folículos en desarrollo (modificada de Rutter y Russo, 2002).

Cuando los niveles de  $\text{P4}$  disminuyen por la luteólisis, cesa su inhibición sobre la GnRH y permite el comienzo de un nuevo ciclo, que variará en su duración dependiendo de la onda de crecimiento folicular que lleva a la siguiente ovulación (Lucy y col., 1992. Figura 1.7).

En el caso de establecerse la preñez, es necesario que haya un reconocimiento materno de la gestación, y entre los días 15 a 17 del ciclo estral es el periodo considerado crítico para garantizar los procesos de protección del cuerpo lúteo (Arosh y col., 2004). Este proceso es regulado por múltiples señales celulares y endocrinas, entre el embrión, el endometrio y el cuerpo lúteo. En el bovino la principal señal para el éxito en el

establecimiento de la preñez es a través del interferón tau (IFN-tau) o proteína trofoblástica bovina tipo 1 (bTP-1), modulando la producción uterina de  $\text{PGF2}\alpha$  y favoreciendo los procesos luteotrópicos funcionales y estructurales, garantizando la producción de progesterona y la integridad de las células que constituyen el cuerpo lúteo (Robinson y col., 2008).



**Figura 1.7** Variaciones en la duración del ciclo estral bovino. Variación en función del cese en la inhibición hipotalámica de la P4, generando la ovulación a partir de la segunda o tercer onda de crecimiento folicular (modificada de Lucy y col, 1992).

## **Balance energético y su impacto en la reproducción**

Los sistemas de producción en bovinos pueden ser lecheros, de cría y de terminación o engorde. Tanto la producción lechera como la de cría dependen de que las vacas presenten ciclos estrales normales que aseguren la preñez. La regulación del ciclo estral es multifactorial y uno de los factores más importantes es el estado nutricional de la hembra (Carrillo, 1997; Chagas y col., 2007).

La relación entre la cantidad de energía consumida por el animal y la requerida para el mantenimiento del mismo, se denomina balance energético (BE) (Bell, 1995; Grummer, 1995). El BE se considera positivo (BEP) cuando la energía ingerida es superior a la que el animal necesita para cubrir sus requerimientos. Bajo estas circunstancias el exceso se acumula como tejido adiposo. Por el contrario, el balance energético negativo (BEN) ocurre cuando lo que ingiere el animal no alcanza para satisfacer los requerimientos energéticos de mantenimiento y de producción. En consecuencia los animales movilizan los depósitos grasos para cubrir el déficit energético (Bell, 1995; Grummer, 1995).

El conocimiento acerca de los mecanismos que regulan la homeostasis corporal se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas. La identificación de redes neuronales hipotalámicas y de neurotransmisores, junto con el descubrimiento de péptidos que envían señales al sistema nervioso central (SNC) informando el estado nutricional del cuerpo, supone un gran avance científico. El hipotálamo juega un papel crucial en la regulación del apetito y del balance energético. Existen diversos núcleos hipotalámicos implicados en el control de la homeostasis energética, siendo el núcleo arcuato uno de los más importantes. El núcleo arcuato está constituido fundamentalmente por dos subpoblaciones neuronales que integran señales implicadas en el control de la ingesta de alimentos y la homeostasis energética; por un lado el neuropéptido Y (NPY) y el péptido

relacionado con la proteína agouti (AgRP) que estimulan la ingesta (efectos orexígenos), y por otro lado la pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito relacionado con cocaína y anfetamina (CART) que inhiben la ingesta (Cone y col., 2001). Además de estos reguladores hipotalámicos del balance energético, existen una serie de reguladores periféricos. En el tejido adiposo encontramos a la leptina, adiponectina y resistina; en el páncreas a la insulina y el polipéptido pancreático (PP); y también las llamadas hormonas gastrointestinales (secretadas por el tracto gastrointestinal) como son el polipéptido YY (PYY), péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y tipo 2 (GLP-2), oxintomodulina (OXM), péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), colecistoquinina (CCK), ghrelina y obestatina (Crespo y col., 2009; Relling y col., 2010).

La vaca, durante las últimas semanas de la gestación, reduce el consumo voluntario de materia seca (Bell, 1995). Después del parto, las hembras tienen cambios fisiológicos importantes que conducen a la involución uterina, la reanudación de la secreción pulsátil de gonadotrofinas hipofisiarias, el restablecimiento del desarrollo de las ondas foliculares, la manifestación del estro y la ovulación (Henao, 2001). Si bien, luego del parto sigue un período de inactividad ovárica (Ball, 2004) conocido como “anestro posparto” (tiempo que transcurre entre el parto y el primer celo posparto) (Henao, 2001), la magnitud del balance energético tiene una importante influencia sobre la reanudación del ciclo. Butler y Smith (1989) encontraron una correlación positiva entre el número de días desde el parto hasta la primera ovulación y los días que se demoran las vacas para alcanzar el nadir del balance energético y mostraron que mientras más corto sea el nadir, más temprano ocurrirá la primera ovulación.

Desde el punto de vista fisiológico, la hembra favorece la lactancia durante la primera etapa de ésta, sobre la fertilidad, ya que existe una priorización de los nutrientes

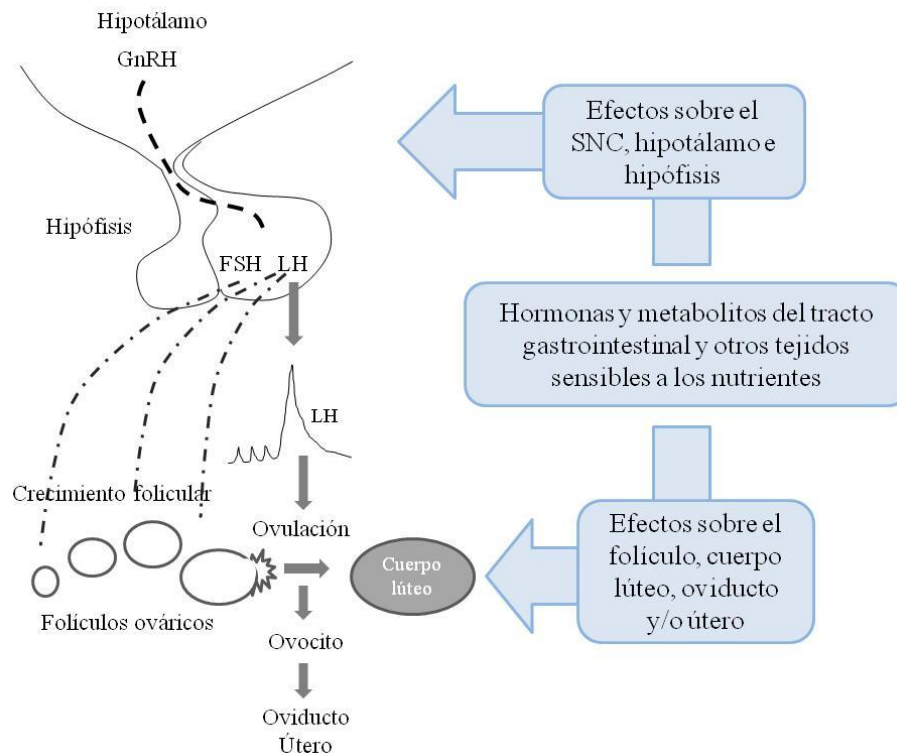
(homeorresis), en el cual los mismos son direccionados a la producción de leche en desmedro de la actividad reproductiva (Lucy, 2003). Por eso el restablecimiento de la actividad ovárica normal después del parto, es indispensable para maximizar la eficiencia reproductiva (Cavestany, 2001).

Las vacas de alta producción lechera se encuentran en BEN durante las primeras nueve semanas de lactancia. El BEN es consecuencia de un rápido aumento en la producción de leche que no es acompañado por un aumento proporcional en el consumo de alimento. Esto lleva a que la vaca lechera tenga que movilizar energía de sus propias reservas desde el tejido adiposo para mantener la producción de leche (Bell, 1995; Grummer, 1995). Esta movilización de grasa viene acompañada por cambios en la concentración de hormonas metabólicas como la hormona de crecimiento (GH), insulina, el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) y ghrelina entre otros (Bauman, 2000; Larsen y col., 2010). Algunos trabajos ponen de manifiesto y asocian a ghrelina al BEN donde se registran altas concentraciones plasmáticas de esta hormona (Bradford y Allen, 2008; Wertz-Lutz y col., 2008 y 2010).

A su vez, durante este período posparto de lactancia, se espera que las vacas comiencen a presentar ciclos estrales normales para darles servicio. No obstante, en animales de alta producción los cambios hormonales mencionados alteran el comienzo del ciclo (Butler, 2000; Lucy, 2003; Lucy, 2007, Lucy, 2008) (Figura 1.8). Dentro de estos cambios los más estudiados son los que ocurren en el eje somatotrófico que involucran a insulina, GH y IGF-1 (Bauman, 2000). Sin embargo, hay indicios que el BEN podría actuar a través de cambios neuroendocrinos que involucren otras señales (Fernandez-Fernandez, 2006; Chagas y col., 2007, Roche y col., 2008).



Como consecuencia de estos cambios hormonales que se producen en el período posparto, se han evidenciado bajas tasas de concepción y el incremento de las tasas de mortalidad embrionaria temprana (Bilodeau-Goeseels y Kastelic, 2006; Bilodeau-Goeseels, 2006). Por otra parte, en un estudio hecho sobre ovocitos recuperados de vacas lecheras en baja condición corporal y fertilizados *in vitro*, se observaron menores tasas de clivaje y de desarrollo, comparadas con las observadas en ovocitos procedentes de vacas lecheras con buena condición corporal (Snijders y col., 2000). Si bien la mayor parte de los estudios en el campo de la nutrición y la reproducción, han trabajado sobre el efecto del BEN y su impacto sobre el desempeño reproductivo (Combe y Hansel, 1973; Bossis y col., 1999; Roche y col., 2000; Wiltbank y col., 2001; Silke y col., 2002), se ha trabajado menos sobre las hormonas metabólicas vinculadas al BEN en el posparto temprano y su impacto sobre el desarrollo embrionario temprano, el cual está determinado por factores que afectan al ovocito dentro del folículo preovulatorio. El compromiso del desarrollo folicular puede estar asociado a mecanismos de señalización que vinculan la nutrición con la reproducción, y la ghrelina podría ser una de las posibles hormonas responsables de regular la función reproductiva durante el BEN experimentado durante el posparto (Fernandez-Fernandez, 2006; Chagas y col., 2007).



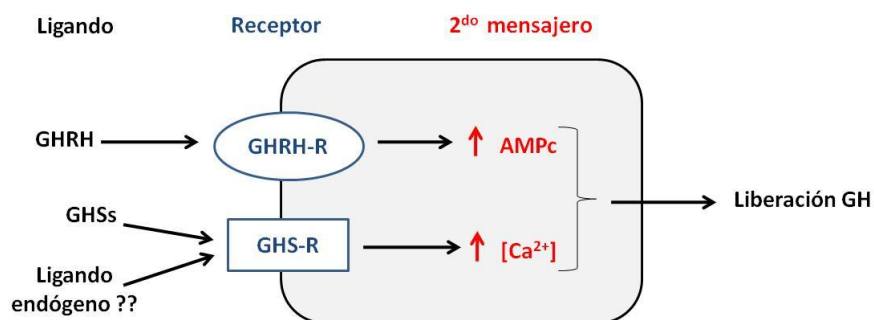
**Figura 1.8** Modelo conceptual del mecanismo a través del cual la nutrición afecta la reproducción en vacas posparto (modificada de Lucy, 2003). Las hormonas y metabolitos del tracto gastrointestinal y los tejidos sensibles a los nutrientes afectan la secreción de GnRH, y en consecuencia de la FSH y LH, a través de su acción sobre el sistema nervioso central e hipotálamo. Estas hormonas y metabolitos pueden tener efectos directos sobre la función ovárica (folículos y cuerpo lúteo) como así también sobre el ovocito, oviducto y útero.

## Descubrimiento de ghrelina

Bowers y col., descubrieron una serie de péptidos sintéticos que eran capaces de provocar la liberación de la hormona de crecimiento (GH) *in vitro* (Bowers y col., 1980). Estos péptidos actúan tanto a nivel hipotalámico como hipofisario (Momany y col., 1984). Posteriormente se lograron sintetizar otros compuestos similares, de naturaleza peptídica y

no peptídica, recibiendo conjuntamente el nombre de “secretagogos de GH” (GHS) (Ghigo y col., 1997). En estudios realizados *in vivo* e *in vitro* se puso de manifiesto que la hormona liberadora de GH (GHRH) aislada en 1982 (Bertherat y col., 1995) y los secretagogos de GH (GHS), actuaban a través de diferentes receptores dado que el mecanismo de acción de GHRH implica una activación de la vía intracelular de la adenilato ciclasa que no se producía en el caso de los GHS.

Durante mucho tiempo se creyó que la secreción pulsátil de GH por parte de las células somatotropas de la hipófisis, estaba controlada únicamente por dos péptidos hipotalámicos con acciones antagónicas: la somatostatina y la GHRH. La somatostatina ejerce una acción inhibitoria sobre la liberación de GH, y la GHRH estimula su liberación. El descubrimiento de los GHS sintéticos puso de manifiesto la existencia de una tercera vía endocrina que controla la liberación pulsátil de GH. El hallazgo y clonación en 1996 del receptor específico para secretagogos de GH (GHS-R) en hipófisis anterior e hipotálamo (Pong y col., 1996) llevó a pensar en la existencia de un ligando endógeno para este receptor que podría ser el que regule la tercera vía neuroendocrina implicada en la regulación de la secreción de GH (Figura 1.9).



**Figura 1.9** Receptor de secretagogos de GH (GHS-R) en una célula somatotropa (modificada de Sato y col., 2012).

En 1999 Kojima y col., lograron identificar y aislar, a partir de extractos de tejido gástrico procedentes de roedores, un péptido de 28 aminoácidos al que llamaron “ghrelina”. Este compuesto se definió como el ligando natural del receptor de secretagogos de GH o GHS-R (Kojima y col., 1999). Luego fue aislado del estómago de diferentes especies, incluido el abomaso del bovino (Takahiro y col., 2001).

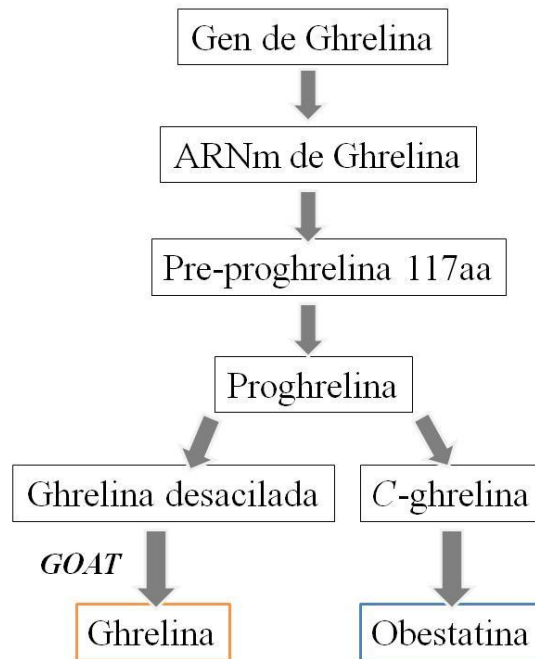
## Estructura y función

Su nombre proviene de la raíz protoindoeuropea “*gh*” (growth hormone) de hormona de crecimiento, y el sufijo “*relin*” (de release) que significa liberación, haciendo referencia a su capacidad de estimular la liberación de GH.

La ghrelina actúa como ligando natural del receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS-R). Esta hormona, en el humano entre otras especies, es un péptido de 28 aminoácidos con un ácido graso de ocho carbonos (grupo *n*-octanoico) en el tercer residuo (Serina) del extremo *N*-terminal. Es la primera hormona en la cual el grupo hidroxilo de una de sus serinas está acilado con un grupo *n*-octanoico, constituyendo el primer ejemplo de acilación de una proteína secretada (Kojima y col., 1999). Se sabe que esta acilación con el ácido graso es esencial para la unión al receptor y por tanto para su actividad biológica (Kojima y col., 1999; Bednarek y col., 2000; Matsumoto y col., 2001).

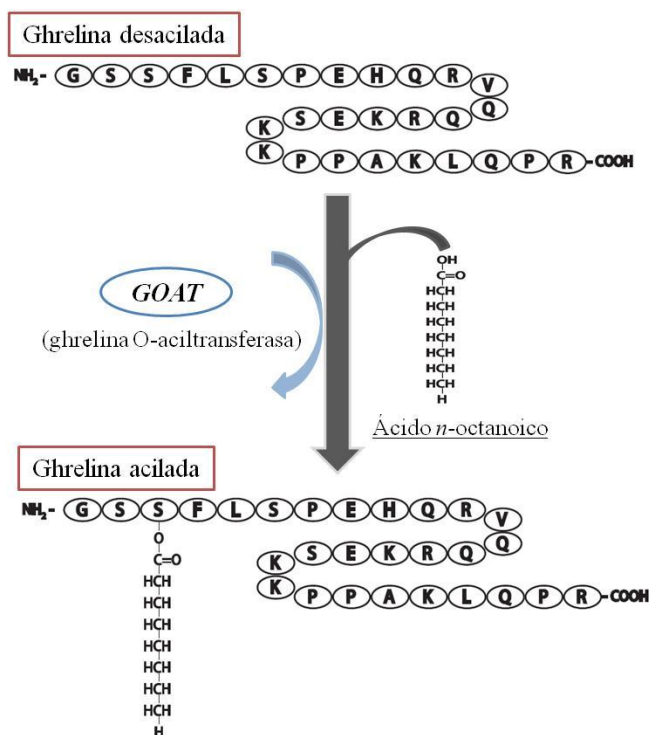
En cuanto a la transformación y la estructura molecular de ghrelina, así como ocurre con la mayoría de las hormonas, el ARNm codifica para una molécula precursora llamada en este caso “prepro-ghrelina” que consta de 117 aminoácidos. De estos 117 aminoácidos, 23 corresponden a una secuencia señal y 94 aminoácidos a la “pro-ghrelina”. Luego el retículo endoplasmático elimina el péptido señal y la acción posterior de una enzima proteolítica sobre la proghrelina, da lugar a la ghrelina madura (28 aminoácidos y un peso

molecular de 3315 daltons) y a un fragmento C-terminal de 66 aminoácidos, la “C-ghrelina” (Kojima y col., 1999; Jeffery y col., 2005; Sato y col., 2012). Finalmente este fragmento C-ghrelina da origen a otro péptido denominado obestatina (Zhang y col., 2005) (Figura 1.10).



**Figura 1.10** Representación esquemática de la síntesis de pre-proghrelina y los péptidos que se generan a partir de esta secuencia de aminoácidos.

La forma acilada de la ghrelina (denominada simplemente “ghrelina”) es la que se caracteriza por la presencia de una cadena de ácidos grasos de ocho carbonos (grupo *n*-octanoico) en el tercer aminoácido (Serina) del extremo *N*-terminal (Figura 1.11).



**Figura 1.11** Estructura de la ghrelina humana acilada y desacilada (modificada de Sato y col., 2012).

Recientemente se identificó la enzima que cataliza la unión del ácido *n*-octanoico a la serina 3 de la ghrelina denominada ghrelina O-aciltransferasa (GOAT) (Yang y col., 2008; Gutierrez y col., 2008) (Figura 1.10 y 1.11). Se trata de una enzima que pertenece a la familia de las O-aciltransferasas unidas a membrana (MBOATs). En ratones, GOAT se localiza en el retículo endoplasmático y cataliza de manera específica la unión covalente del ácido *n*-octanoico a la serina 3 de la ghrelina, mientras que en humanos, GOAT puede también acilar a la ghrelina con otros ácidos grasos (Hofmann y col., 2000; Tanaka y col., 2001). Esta acilación es esencial para la unión a su receptor, para llevar a cabo la liberación de GH, y para la mayoría de sus otras acciones endocrinas (Kojima y col., 1999; Matsumoto y col., 2001). El descubrimiento de GOAT y la importancia de la acilación de la ghrelina para su actividad, le otorga un papel más determinante a las modificaciones

postraduccionales y una mayor importancia tanto en el papel fisiológico de la ghrelina como así también a la de ghrelina desacilada. Se observó que la GOAT se expresa en cantidades variables en: estómago, páncreas, colon, corazón, hígado, músculo, hipófisis, glándula salivar, testículo, timo, hipotálamo, tejido adiposo, glándula adrenal, placenta y ovario dependiendo de la especie estudiada (Gutierrez y col., 2008; Yang y col., 2008; Sakata y col., 2009,).

Se han identificado otras isoformas de ghrelina producto del mismo gen, y se las ha clasificado teniendo en cuenta la presencia o no de la acilación, el número de carbonos que posee el ácido graso, y la cantidad de aminoácidos que forman el péptido final (Hosoda y col., 2003). En estómago de rata se identificó una isoforma a la que se denominó des-Gln14-ghrelina (Hosoda y col., 2000a). Esta variante tiene también la esterificación en el residuo 3 de serina, idéntica a la ghrelina, excepto en una glutamina que se ha perdido en posición 14, posiblemente a través de *splicing* alternativo del gen de la ghrelina. Aunque la actividad de ambas es la misma, la forma des-Gln14-ghrelina está presente sólo en cantidades muy bajas en el estómago y otros tejidos, indicando que la ghrelina (con todos sus aminoácidos) es la forma activa de mayor importancia (Hosoda y col., 2000a).

Tanto en estómago como en plasma la proporción de ghrelina desacilada es mayor que la de ghrelina (Hosoda y col., 2000b). La ghrelina tiene una corta vida media en plasma (~8 minutos) con respecto a la forma desacilada, quizás pueda ser una de las razones por las que al evaluar la concentración plasmática de esta hormona, alrededor del 80 al 90% de la ghrelina circulante corresponde a la forma desacilada (Kojima y col., 1999; Hosoda y col., 2000b y 2004). Por otro lado, se propuso que la ghrelina acilada plasmática podría sufrir una desacilación. Aunque el mecanismo de desacilación de la ghrelina no se conoce, se sabe que la ghrelina acilada en plasma se une a lipoproteínas de

alta densidad (HDL) que tienen actividad esterasa y paraxonasa (Beaumont y col., 2003). Se postuló entonces, que estas enzimas, principalmente relacionadas con las HDLs, podrían estar implicadas en la desacilación de la ghrelina, teniendo en cuenta que la unión del ácido graso a la serina 3 es un enlace éster. En estudios posteriores, llevados a cabo por Shanado y col., (2004), se observó que la administración de ghrelina exógena en una solución de plasma no incrementó la concentración de ghrelina desacilada, lo que indicaría que la enzima encargada de regular la conversión de ghrelina en ghrelina desacilada no estaría presente en plasma.

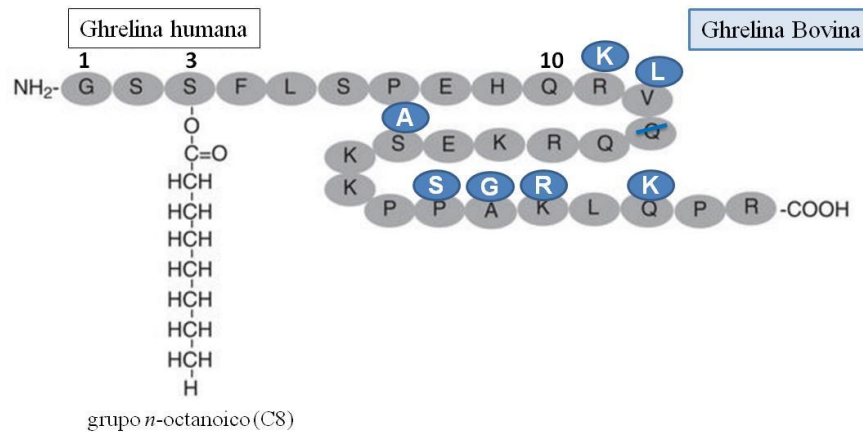
Aunque la forma acilada es la que inicialmente se describió como la forma activa y responsable de la mayor parte de los efectos biológicos, recientemente se ha encontrado que la forma desacilada ha mostrado una serie de efectos mediados por un receptor distinto al GHS-R (Cassoni y col., 2004; Thompson y col., 2004; Delhanty y col., 2006).

Si bien la hormona en el humano, ratón, perro y cerdo está formada por 28 aminoácidos, en el bovino consta de 27 aminoácidos, al igual que en la oveja (Figura 1.12 y 1.13). Lo interesante es que se ha encontrado un alto grado de similitud en todos los mamíferos en los que se han estudiado las secuencias de aminoácidos de ghrelina (Van der lely y col., 2004), de hecho, los 10 aminoácidos N-terminales son idénticos (Figura 1.12), y la acilación del residuo en posición 3 se ha encontrado no sólo en mamíferos sino en todas las especies de vertebrados estudiados incluyendo aves, reptiles, anfibios y peces (Kojima y Kangawa, 2005).



1	3									10	13															28					
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	R	V	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	HUMANO			
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	<b>K</b>	<b>A</b>	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	RATA/RATÓN			
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	<b>K</b>	<b>L</b>	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	P	A	K	L	Q	P	R	PERRO			
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	<b>K</b>	<b>V</b>	Q	Q	R	K	E	S	K	K	P	<b>A</b>	<b>A</b>	K	L	<b>K</b>	P	R	CERDO			
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	<b>K</b>	<b>L</b>	-	Q	R	K	E	<b>P</b>	K	K	P	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	L	<b>K</b>	P	R	OVEJA			
G	S	S	F	L	S	P	E	H	Q	<b>K</b>	<b>L</b>	-	Q	R	K	E	<b>A</b>	K	K	P	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	L	<b>K</b>	P	R	BOVINO			

**Figura 1.12** Comparación de la estructura primaria de la ghrelina humana y las diferentes especies domésticas. Las letras en “negrita” indican que el residuo es diferente a la estructura de ghrelina humana; las líneas indica la ausencia del residuo en posición 13 (oveja y bovino) (modificada de Van der lely y col., 2004).



**Figura 1.13** Estructuras de la ghrelina humana en comparación a la del bovino. La ghrelina humana consta de 28 aminoácidos, mientras que la ghrelina en el bovino (representadas por los residuos en letra blanca con fondo azul) tiene 27aa (está ausente la glutamina de la posición 13). Ambas presentan la modificación por un ácido graso (n-octanoico) en la serina 3. Esta modificación es esencial para la actividad de la ghrelina (Modificada de Kojima y Kangawa, 2005).

En la mayor parte de las especies estudiadas, las funciones atribuidas a la ghrelina incluyen su capacidad de estimular la secreción de GH (Kojima y col., 1999), su potente efecto orexígeno (Nakazato y col., 2001), su efecto modulador del balance energético y aumento de la adipogénesis, entre otros (Tschop y col., 2000; Tang-Christensen y col.,

2004). En los últimos años, se ha estudiado el efecto de esta hormona sobre la actividad proliferativa de diferentes líneas celulares, incluyendo células neoplásicas (Tian y col., 2012; Li y col., 2014). En diferentes estudios se han observado efectos opuestos, por un lado, a través de un efecto proapoptótico, inhibiendo la proliferación celular (Ghe y col., 2002; Volante y col., 2003; Barreiro y col., 2004; Bonfili y col., 2013), y por otro lado, estimulando la proliferación celular (Kim y col., 2004, 2005; Tian y col., 2012; Li y col., 2014). Recientemente, se ha postulado la participación de esta hormona en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Tena-Sempere, 2008; Zhang y col., 2008; Lorenzi y col., 2009; Dupont y col., 2010) y se ha descrito la expresión del ARNm para ghrelina y su receptor en ovario de diferentes especies, incluyendo al bovino (Caminos y col., 2003b; Gaytan y col., 2003; Sirotkin y col., 2006; Zhang y col., 2008; Du y col., 2009; Deaver y col., 2013).

### **Síntesis y regulación de la secreción de ghrelina**

El estómago y el duodeno producen el 65% de la ghrelina circulante en el organismo (Ariyasu y col., 2001; Dornonville y col., 2001; Pekic y col., 2006; Popovic y col., 2005). Sin embargo, se ha encontrado expresión de esta hormona en múltiples tejidos. Esto se puso de manifiesto cuando después de una gastrectomía se observó que los niveles plasmáticos de ghrelina se reducían solamente en un 65% (Ariyasu y col., 2001; Dornonville y col., 2001; Popovic y col., 2005; Pekic y col., 2006), lo que llevó a pensar que otros tejidos podrían estar produciendo el péptido. Es así, que se ha encontrado expresión de ghrelina en hipotálamo (Kojima y col., 1999), hipófisis (Caminos y col., 2003a), células inmunes (Hattori y col., 2001), pulmón (Volante y col., 2002), riñón (Mori

y col., 2000), condrocitos (Caminos y col., 2005), cardiomiocitos (Iglesias y col., 2004), placenta (Gualillo y col., 2001), testículo (Tena-Sempere y col., 2002) y ovario (Caminos y col., 2003b; Gaytan y col., 2003), entre otros. Estos hallazgos ponen de manifiesto la diversidad y complejidad de funciones de la ghrelina.

Se ha descrito que esta hormona se secreta de manera pulsátil, y su concentración varía notablemente durante el día, con aumentos en los niveles circulantes inmediatamente antes de la ingesta de alimentos y una caída en sus niveles durante el período postprandial (Tschop y col., 2001; Cummings y col., 2001, 2004; Relling y col., 2010a, 2010b; Larsen y col., 2010).

Dado que la mayoría de la ghrelina circulante tiene un origen gástrico, es razonable pensar que la disminución en los niveles de ghrelina observada tras la ingesta, así como la sensación de saciedad tiene su origen en el estómago.

La ghrelina es producida en el estómago por células enteroendocrinas. Estas células representan la mayor población endocrina de la mucosa oxíntica y el 20% de éstas expresan ARNm de ghrelina (Date y col., 2000). Existen dos tipos de células productoras de ghrelina, las células cerradas y las células abiertas que están en contacto con el lumen (Sakata y col., 2002). Estas células, denominadas células X/A, contienen gránulos densos y compactos de ghrelina (Date y col., 2000). La secreción de ghrelina va directamente al sistema porta para circular así a través de todo el cuerpo.

Las células endocrinas abiertas productoras de ghrelina en el tracto gastrointestinal, están principalmente reguladas por señales relacionadas con el contenido luminal, mientras que las células cerradas productoras de ghrelina reciben modulación por hormonas, estimulación neuronal y distensión mecánica (Solcia y col., 2000). Estudios inmunohistoquímicos revelaron que las células productoras de ghrelina eran abundantes

desde el cuello hasta la base de las glándulas oxínticas en vaca, oveja, cerdo, y estómago de caballos (Hayashida y col., 2001).

Dado que se ha encontrado la expresión de ghrelina en diferentes tejidos del organismo, la regulación de la secreción y sus efectos pueden ocurrir a diferentes niveles. Si bien el mecanismo celular que regula la secreción de ghrelina no se conoce totalmente, se observó que los niveles circulantes de esta hormona se encuentran influenciados por el estado energético del individuo (Hosoda y col., 2002; Perez-Tilve y col., 2006; Bradford y Allen, 2008; Wertz-Lutz y col., 2008; Larsen y col., 2010). También se ha puesto de manifiesto que la expresión de la ghrelina puede estimularse por la hipoglucemia (Broglia y col., 2004) y suprimirse por hiperglucemia (Nakagawa y col., 2002).

En los rumiantes la ghrelina ha sido menos estudiada con respecto al no-rumiantes, por tal motivo su rol es menos conocido. En ovinos (Sugino y col., 2002), bovinos de carne (Wertz-Lutz y col., 2006; 2008) y bovinos de leche (Roche y col., 2006a y 2008; Bradford y Allen, 2008; Relling y col., 2010a, 2010b) alimentados ad libitum, la concentración plasmática de ghrelina aumenta antes de alimentarse y luego disminuye en la mayoría de los casos. Similares resultados en cuanto a la fluctuación de la concentración de ghrelina pre y postprandial se ha encontrado en terneros (Wertz-Lutz y col., 2006).

### **GHS-R (Receptor de secretagogos de GH)**

Los receptores para secretagogos de GH pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) con siete dominios transmembrana (tres dominios intracelulares y tres extracelulares) (Probst y col., 1992). A esta familia de receptores se incluyen el receptor de motilina (GPR-38) , los receptores 1 y 2 de neurotensina, los

receptores 1 y 2 de neuromedina, y el receptor de la obestatina (GPR-39) hasta hace poco considerado como un receptor huérfano (Zhang y col., 2005). Se describen dos variantes del receptor GHS-R que actualmente se denominan forma 1a (GHS-R1a) y forma 1b (GHS-R1b) (Howard y col., 1996; Gnanapavan y col., 2002). El GHS-R1a consta de 366 aminoácidos con siete dominios transmembrana y una masa molecular de  $\sim 41$  kDa, mientras que el GHS-R1b, producto truncado del mismo gen, es un receptor más corto, con 289 aminoácidos y cinco segmentos transmembrana (Howard y col., 1996; McKee y col., 1997). El receptor de ghrelina tipo 1a es activado tanto por ghrelina como por los secretagogos de GH (GHSs), mientras que el tipo 1b no es activado por ninguno de estos compuestos (Smith y col., 1997; Howard y col., 1996; Smith y col., 2001; McKee y col., 1997; Gnanapavan y col., 2002).

En los últimos años, algunas evidencias empezaron a hacer pensar a los investigadores en la existencia de uno o varios receptores de ghrelina distintos al receptor clásico GHS-R. El grupo de Cassoni y col. (2001) observaron en tres líneas celulares humanas de cáncer de mama (MCF7, T47D y MDA-MB231) que el ARNm para el receptor GHS-R1a no se expresaba, y demostraron que tanto ghrelina como los GHSs, utilizados en el estudio, causaron una disminución de la proliferación celular de estas líneas tumorales (Cassoni y col., 2001). Por otro parte, Baldanzi y col. (2002) trabajando sobre línea cardiomiocitaria H9c2, observaron que la administración de ghrelina o ghrelina desacilada provocaban un efecto cardioprotector activando rutas de señalización intracelulares anti-apoptóticas (ERK1/2 y PI-3-kinasa/Akt), a pesar de que estas células no expresan GHS-R1a. Como vemos, algunos trabajos describen acciones tanto de la ghrelina como de la ghrelina desacilada en diversos tipos celulares, en alguno de los cuales no existe expresión del receptor GHS-R1a, estos hallazgos sugieren la presencia de uno o

varios receptores, distintos al GHS-R1a, capaces de modular la señal generada tras la unión de ghrelina o ghrelina desacilada (Baldanzi y col., 2002; Zhang y col., 2004). Esta hipótesis se apoya además en el hecho de que a pesar de que la ghrelina desacilada no es capaz de unirse al GHS-R1a (Kojima y col., 1999), se observó que el péptido tiene actividad biológica (Cassoni y col., 2004). Un estudio realizado en ratones que sobreexpresaban a ghrelina desacilada, mostró una disminución en la ingesta de alimentos y el vaciamiento gástrico, y un aumento en la expresión génica de neuropéptidos hipotalámicos (POMC y CART) luego de la administración de ghrelina desacilada (Asakawa y col., 2005).

En cuanto a los sistemas de señalización activados por el GHS-R1a, el mecanismo de transducción de señales más estudiado es el involucrado en la secreción de GH. Este comienza con la unión ligando-receptor y la activación de la vía de la fosfolipasa C (PLC) a través de la subunidad Gq. Seguidamente, la PLC escinde un lípido de membrana (fosfolípido de inositol) dando lugar al diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). El DAG activa la proteína cinasa C (PKC), mientras que el IP<sub>3</sub> generado, activa la liberación de calcio de los depósitos del retículo endoplasmático (Kojima y col., 2001). A su vez, como consecuencia de la unión ligando-receptor, se produce una inhibición de los canales de potasio, permitiendo la entrada de calcio a través de canales de voltaje tipo L y tipo T. La elevada concentración de calcio intracelular provoca la liberación exocítica de GH al medio extracelular (Chen y col., 1990; Anderson y col., 2004; Balla 2006) (Figura 1.9).

Una parte importante de la regulación de los receptores acoplados a proteína G (GPCR) es la internalización inducida por el agonista desde la membrana plasmática a los compartimentos intracelulares (Freedman y Lefkowitz, 1996). A pesar de su diversidad, la

mayoría de los GPCR están regulados por un mismo mecanismo de desensibilización (Freedman and Lefkowitz, 1996). Los GPCRs pueden ser desensibilizados, tras su activación por agonistas, a causa de la fosforilación por miembros de la familia de cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs). A estos receptores fosforilados se unen arrestinas que evitan estimulaciones sucesivas de las proteínas G y por lo tanto, el desencadenamiento de nuevas vías de señalización. El complejo GPCR/arrestina recluta componentes de la maquinaria de endocitosis como son la proteína adaptadora 2 (AP-2) y la clatrina llevando a la internalización del receptor. La determinación de la cinética de reciclaje y desensibilización depende si el receptor se internaliza con o sin las arrestinas (Perry y Lefkowitz, 2002). En este sentido, recientes investigaciones han estudiado la vía de señalización del receptor de ghrelina y su relación con la  $\beta$ -arrestina (Tama y col., 2014).

Se ha descrito que a través de las proteínas G se activan ciertas vías de señalización, las cuales se creían activadas por receptores de factores de crecimiento a través de tirosina cinasa. Un ejemplo característico es la activación de las rutas de señalización de las MAP cinasas (MAPK, proteína cinasa activada por mitogenos), entre las que se encuentran ERK (cinasa regulada por señal extracelular) y p38 (Crespo y col., 1995; Yamauchi y col., 1997). A su vez, la activación de estas rutas de señalización propias de los factores de crecimiento, también se puede dar a través de los receptores acoplados a proteína G sin la intervención de las propias proteínas G (Lefkowitz, 1998; Luttrell y col, 1999), un fenómeno que diversifica aún más el campo de acción de estos receptores. Muchos receptores acoplados a proteína G emplean simultáneamente diferentes mecanismos para la activación de MAPK (Pierce y col, 2001). La gran cantidad de interacciones moleculares en las que participan los receptores acoplados a proteína G nos lleva a tener que abordarlos y comprenderlos, no como unidades independientes sino en interacción con señales

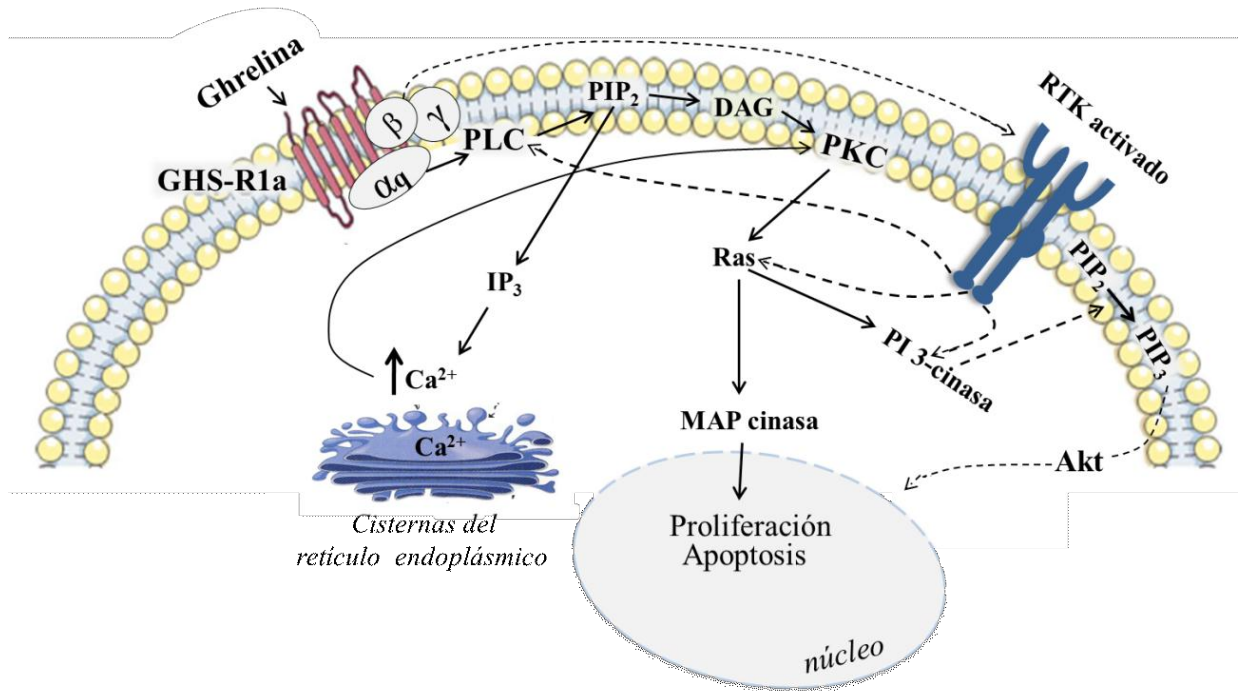
procedentes de otros receptores, proteínas estructurales, microdominios de membrana, enzimas y otros componentes celulares.

En el caso concreto de la ghrelina, la unión al receptor GHS-R1a conlleva a la internalización del complejo ligando-receptor en vesículas de clatrina (vía endosomas) hacia el compartimento intracelular. Posteriormente el receptor GHS-R1a se clasifica en endosomas para su reciclaje a la membrana. La internalización del receptor GHS-R1a implica una desensibilización homóloga, es decir, esta desensibilización puede desencadenar: a) una inhibición del acoplamiento entre el receptor y los elementos de transducción de respuesta, b) una reducción en el número de receptores, ya sea por secuestro hacia el interior de la célula, degradación metabólica o reducción en la síntesis de nuevas proteínas receptoras, o c) una disminución en la afinidad (Holst y col., 2004). Estudios de unión de radioligando y de microscopía confocal demostraron que la internalización de GHS-R1a se correlaciona positivamente con el tiempo de exposición a ghrelina, siendo máxima la internalización a los 20 minutos. De esta forma, el nivel de receptores en la superficie celular alcanza de nuevo el 100% a los 360 minutos, tras la estimulación con ghrelina, recuperando su capacidad de unión y funcionalidad (Camiña, 2006).

Por otra parte, Holst y col., (2003) descubrieron que el receptor de la hormona ghrelina generaba una cierta actividad en ausencia de su ligando peptídico. Esta propiedad que muestra el receptor se desconoció durante muchos años debido a que la movilización del calcio intracelular se había utilizado casi exclusivamente para monitorizar la actividad de transducción de señales de este receptor (Smith y col., 2001). Cuando se midió la concentración del inositol 1, 4, 5-trifosfato ( $IP_3$ ), como reflejo de la actividad fosfolipasa mediada por Gq, se hizo evidente que el receptor de ghrelina tenía una importante



actividad constitutiva (Holst y col., 2003). La actividad constitutiva en el receptor se vincula a que cierto número de receptores pueden activarse espontáneamente en ausencia de su ligando. Esto supone la existencia de al menos dos conformaciones diferentes del receptor, siendo una su forma activada y la otra la forma inactiva, las cuales fisiológicamente están en equilibrio. Sin embargo en los receptores con este tipo de actividad una pequeña fracción del receptor estaría siempre en conformación activada, en ausencia del ligando, por lo que habría una pequeña actividad basal (Holst y col., 2004). Sin embargo, cuando se investigó la actividad constitutiva del receptor de ghrelina se observó que esa pequeña actividad basal, sin estímulo del ligando, no activaba la vía de señalización de MAPK (Holst y col., 2004). Al parecer, la actividad constitutiva del receptor podría activar cualquiera de las vías de señalización inducida por el ligando, pero quizás, no actúe sobre todas ellas (Whistler y col., 2002). En la Figura 1.14 se muestra una representación esquemática de los mecanismos de acción sugeridos para ghrelina a través de su receptor GHS-R1a.



**Figura 1.14** Mecanismos propuestos para la acción de ghrelina luego de unirse a su receptor (GHS-R1a) (Nanzer y col., 2004; Chung y col., 2008). Luego de su unión al receptor GHS-R1a a través de la subunidad  $\alpha$ , se activa la vía PLC-PKC que desencadena la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico, el cual puede actuar sobre PKC, y por otro lado la activación de la vía Ras-MAP quinasa (MAPK). La activación del GHS-R1a a través de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  (línea punteada), también pueden conducir a la activación de un receptor tirosina quinasa (RTK) que activa las vías de Ras-MAPK, PI3-quinasa/Akt y PLC. Por último, la proteína Ras puede activar a PI3-quinasa/Akt. Finalmente, a través de estas vías que utilizan componentes comunes para transmitir sus señales, se logra regular la función de otras proteínas efectoras como también la transcripción génica. **PLC:** fosfolipasa C; **DAG:** diacilglicerol; **PKC:** proteincinasa C; **PI3-quinasa:** fosfoinositol 3-quinasa; **IP<sub>3</sub>:** inositol 1, 4, 5-trisfato; **PIP<sub>2</sub>:** fosfolípido de inositol bifosfato (modificada de Frago y col., 2011).

El análisis molecular del GHS-R en diferentes especies como cerdo, humano, rata, ratón y perro, revela que el receptor se encuentra altamente conservado a lo largo de la evolución (McKee y col., 1997; Probst y col., 1992; Smith y col., 2001).

Un punto a destacar es que tanto la GH como la hormona anorexigénica leptina inhiben la expresión de GHS-R1a en el núcleo arcuato. Por el contrario, la ghrelina aumenta los niveles de expresión del GHS-R1a (Nogueiras y col., 2004). Al parecer la ghrelina y la leptina podrían desempeñar papeles complementarios en un sistema que regula e informa al sistema nervioso central sobre el balance energético (Nass y col., 2000; Nogueiras y col., 2004).

En un principio, se creía que el receptor GHS-R1a se expresaba exclusivamente en distintos núcleos del cerebro relacionados con distintas funciones atribuidas a ghrelina como el control del apetito, el balance energético, y la liberación de GH. Sin embargo, se ha encontrado expresión del ARNm de GHS-R1a en diferentes tejidos. Existen evidencias de la expresión de GHS-R1a no solo en hipófisis y en hipotálamo, sino también en múltiples órganos periféricos como estómago, intestino, páncreas, tiroides, glándula adrenal, corazón y gónadas (Smith y col., 1997; Gnanapavan y col., 2002; Gaytan y col., 2003, 2004). Por otra parte, la variante del receptor GHS-R1b presenta una amplia distribución tisular en humanos, aunque se desconoce la razón de su ubicación (Gnanapavan y col., 2002).

## **Vínculo entre la nutrición, ghrelina y la reproducción**

El estado nutricional tiene una importante influencia en el comportamiento reproductivo de la hembra bovina, pero el mecanismo por el cual se ve afectado dicho desempeño es poco conocido (Carrillo, 1997; Chagas y col., 2007). A su vez el estado nutricional es un importante regulador de los niveles de ghrelina endógena (Bradford y Allen, 2008; Wertz-Lutz y col., 2008).

Con el transcurso del tiempo el mejoramiento genético de las vacas lecheras se ha centrado principalmente en el aumento de la producción de leche. Esta situación trae aparejado un aumento en la incidencia de trastornos reproductivos, posiblemente relacionados con el grado en que el BE se convierte en negativo en el posparto temprano (Gröhn y col., 1994). El inicio de la lactancia y la transición metabólica hacia el pico de producción de leche son dos eventos que ocurren rápidamente en los bovinos lecheros (Bell, 1995). El rápido incremento en los requerimientos de lactación causa un BEN durante el posparto temprano que puede prolongarse varias semanas. Esta condición determina una respuesta compensatoria (homeorresis) donde los nutrientes son prioritariamente asignados para la producción lechera. Esta repartición de nutrientes y el BEN están asociados a ciertos perfiles de metabolitos en sangre como los ácidos grasos no esterificados (AGNE), el  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) y la glucosa (Relling y Mattioli, 2010). También genera cambios en los perfiles de ciertas hormonas metabólicas como la insulina, la GH, el IGF-I y la ghrelina (Bauman, 2000; Butler, 2000; Lucy, 2003; Lucy, 2007; Lucy, 2008; Larsen y col., 2010). Algunos trabajos ponen de manifiesto y asocian a ghrelina al BEN, situación en la que esta hormona se encuentra en altas concentraciones plasmáticas (Bradford y Allen, 2008; Wertz-Lutz y col., 2008 y 2010). A su vez se observó que esta hormona juega un papel importante en la regulación del consumo a corto plazo (iniciación y terminación de una comida) (Iqbal y col., 2006; Roche y col., 2008; Wertz-Lutz y col., 2006). Es así que la ghrelina ha surgido como un factor de iniciación de la ingesta que informa al SNC sobre el estado del balance energético, pudiendo actuar como señal que regule la función reproductiva (Fernandez-Fernandez y col., 2004 y 2006; García y col., 2007; Zhang y col., 2007; Tena-Sempere 2008; Dupont y col., 2010).

La ghrelina puede atravesar la barrera hematoencefálica (Banks y col., 2002) y ligarse a sus receptores en el cerebro. Esta hormona actúa a nivel hipotalámico como ligando endógeno del GHS-R (Kojima y col., 1999). En neuronas del núcleo arcuato, la ghrelina aumenta la expresión de ciertos péptidos entre los que se encuentra el neuropéptido Y (NPY) (Wang y col., 2002). El NPY, más allá de sus efectos orexígenos, también es un potente inhibidor de la liberación de LH (Houseknecht y col., 1998; Wang y col., 2002), actuando como un importante neurotransmisor generando este vínculo entre la nutrición y la reproducción (Morrison y col., 1999; Barb y col., 1999). Los cambios en la expresión del NPY constituyen el mecanismo indirecto por el cual la ghrelina contribuiría a regular el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, y así influir sobre el ciclo estral (Furuta y col., 2001; Fernandez-Fernandez, 2006; Iqbal y col., 2006; Tena-Sempere, 2008).

Por otro lado, se ha demostrado que el péptido ghrelina se expresa en los folículos ováricos de oveja a lo largo de todos los estadios del desarrollo folicular, así como también en el cuerpo lúteo funcional (Du y col., 2009). El ARNm de la ghrelina y su receptor se expresan en el ovario de humano, rata, cerdos, ovejas y pollos (Caminos y col., 2003b; Gaytan y col., 2003; Miller y col., 2005; Sirotkin y col., 2006; Zhang y col., 2008). Estos hallazgos hacen pensar en una regulación directa de la ghrelina a nivel gonadal. Recientemente, en un estudio realizado en bovinos se logró localizar a ghrelina y su receptor en algunos tejidos de órganos reproductivos (Deaver y col., 2013), pero hasta el momento no se ha descrito la presencia de la hormona y su receptor en el complejo ovocito-*cumulus* (COC) de bovino. La presencia del sistema de señalización de la ghrelina en los COC bovinos, abre la posibilidad de un potencial rol regulador de esta hormona en la función reproductiva.

Los estudios en relación a ghrelina y su efecto sobre la reproducción también se vieron en el modelo de producción *in vitro* de embriones, en diferentes especies. Estudios recientes han evaluado el efecto del agregado de ghrelina al medio de maduración *in vitro* de ovocito porcinos (Suzuki y col., 2010). Si bien en este estudio se observó que la ghrelina retrasa el progreso de la meiosis y produce cambios en la distribución del citoesqueleto, estudios realizados en otras especies sobre el efecto de la hormona en la maduración de ovocitos y el desarrollo embrionario temprano, reportan efectos contrarios (Zhang y col., 2007; Wangy col., 2013; Dashtizad y col., 2011). Estos resultados contradictorios entre los diferentes estudios, se suman a que la información sobre el efecto directo de la ghrelina en la maduración de ovocitos, y particularmente en la especie bovina, es muy limitada.

## Objetivo de la Tesis

El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar el efecto de la ghrelina en distintas concentraciones, dentro de valores fisiológicos, sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos bovinos durante el período de maduración (maduración meiótica + citoplasmática) y su impacto en el desarrollo embrionario posterior. Para ello, se utilizó como modelo experimental la técnica de producción *in vitro* de embriones bovinos.

Los objetivos específicos para llevar a cabo el presente trabajo de tesis fueron:

1. Investigar la expresión del ARNm de la hormona ghrelina y su receptor (GHS-R1a) mediante PCR en Tiempo Real en el ovocito y las células del *cumulus* de bovino (Capítulo 2).

2. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de la hormona ghrelina durante la maduración de ovocitos bovinos (Capítulo 3).
3. Analizar la capacidad de desarrollo de los ovocitos madurados con diferentes concentraciones de la hormona ghrelina hasta el estadio preimplantacional de blastocisto, y determinar la calidad de los embriones obtenidos (Capítulo 4).

### **Hipótesis más relevante**

Concentraciones crecientes de ghrelina perjudican el proceso de maduración de los ovocitos bovinos disminuyendo su capacidad de desarrollo embrionario posterior hasta el estadio preimplantacional de blastocisto.

## **Capítulo 2**

### **DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GHRELINA Y SU RECEPTOR GHS-R1A EN EL COC BOVINO**



## Introducción

La forma activa de la ghrelina bovina es un péptido de 27 aminoácidos que presenta una modificación en la serina 3 por un ácido graso (*n*-octanoico), esencial para la activación de su receptor GHS-R1a (Dickin y col., 2004; Van der Lely y col., 2004).

Si bien la ghrelina es secretada principalmente por las células enteroendócrinas X/A de la mucosa oxíntica del estómago, la expresión de ghrelina también se ha observado en varios tejidos periféricos, incluyendo el hipotálamo (Kojima y col., 1999), hipófisis (Caminos y col., 2003a), células inmunes (Hattori y col., 2001), pulmón (Volante y col., 2002), riñón (Mori y col., 2000), condrocitos (Caminos y col., 2005), cardiomiocitos (Iglesias y col., 2004), placenta (Gualillo y col., 2001), testículo (Tena-Sempere y col., 2002) y ovario (Caminos y col., 2003b; Gaytan y col., 2003), entre otros. Estos hallazgos ponen de manifiesto la diversidad y complejidad de funciones de la ghrelina.

El receptor funcional de la ghrelina es un receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R1a) que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y que posee siete dominios de transmembrana (Howard y col., 1996; McKee y col., 1997). El análisis molecular del GHS-R en diferentes especies como el cerdo, el hombre, la rata, el ratón, y el perro, revela que el receptor se encuentra altamente conservado a lo largo de la evolución (Probst y col., 1992; Smith y col., 2001). En un principio se creía que este receptor se expresaba exclusivamente en distintos núcleos del cerebro relacionados con distintas funciones centrales atribuidas a la ghrelina como el control del apetito, el balance energético y la liberación de GH; pero se ha encontrado expresión del ARNm de GHS-R1a en diferentes tejidos. Existen evidencias de la expresión de GHS-R1a no solo en hipófisis y en hipotálamo, sino también en múltiples órganos

periféricos como estómago, intestino, páncreas, tiroides, gónadas, glándula adrenal y corazón (Smith y col., 1997; Gnanapavan y col., 2002; Gaytan y col., 2003).

La ghrelina, además de estimular la secreción de GH, promueve el apetito y afecta el comportamiento alimenticio, regulando el consumo de alimento a corto plazo (Kojima y Kanagawa, 2005; Wertz-Lutz y col., 2006). Las concentraciones circulantes de ghrelina aumentan durante el ayuno o el BEN, y se observó que la administración exógena de la hormona estimula el consumo de alimento en el bovino (Wertz-Lutz y col., 2006; Bradford y Allen, 2008). Esta hormona también influye en el metabolismo energético y aumenta la eficiencia metabólica en roedores (Tschop y col., 2000), y bovinos (Itoh y col., 2006). Así pues, parece que la ghrelina es un componente clave del metabolismo implicado en la respuesta fisiológica a la insuficiencia de energía.

Las vacas experimentan a menudo estados de insuficiencia energética durante los ciclos normales de producción, especialmente durante el comienzo de la lactancia cuando la demanda metabólica es alta debido a la producción de leche. En estos animales, el BEN se asocia con problemas en la fertilidad, que es muy probablemente una respuesta adaptativa para evitar demandas metabólicas adicionales asociadas con una nueva preñez (Lucy y col., 1992; Beam y Butler, 1997).

Estudios realizados en diferentes especies han determinado la expresión de ghrelina y GHS-R1a en varios tejidos reproductivos tales como el ovario (Gaytan y col., 2003; Zhang y col., 2008; Du y col., 2010), el útero (Deaver y col., 2013) y la placenta (Gualillo y col., 2001). Por otro lado se observó, en ensayos *in vitro*, que el desarrollo preimplantacional de embriones de ratón era inhibido en presencia de ghrelina (Kawamura y col., 2003). Estos efectos sobre el desarrollo embrionario son de particular interés ya que algunos autores han demostrado que en vacas que experimentan BEN (Wertz-Lutz y col., 2006), así como en

aquellas vacas de alto mérito genético para la producción de leche (Roche y col., 2006a, 2006b), se observan altas concentraciones circulantes de ghrelina. Estos datos, sumados a la incidencia de trastornos reproductivos en las vacas y relacionados con el grado de BEN, nos llevan a pensar que la ghrelina podría estar implicada en la pérdida embrionaria temprana y en la disminución de la fertilidad en estas hembras.

Como primer paso hacia la comprensión de las interacciones entre ghrelina y la fertilidad en el bovino, el objetivo del presente capítulo fue estudiar la expresión de la hormona ghrelina y GHS-R1a en ovocitos y CC del COC bovino.

## **Materiales y métodos**

### **Técnica de producción in vitro de embriones bovinos**

La producción *in vitro* de embriones (PIV) involucra tres etapas fundamentales: 1) maduración *in vitro* (MIV), 2) fecundación *in vitro* (FIV) y 3) cultivo *in vitro* de embriones (CIV). Para la MIV de ovocitos bovinos se utilizó el medio de cultivo TCM-199 suplementado con LH, FSH y suero fetal bovino (SFB). Para la FIV se empleó el TALP (Parrish y col. 1984) y para el CIV el medio SOFm (*Synthetic Oviduct Fluid*, Tervit y col. 1972; modificado, Gardner y col., 1994). El éxito de la FIV depende de la calidad de las gametas, de la composición de los medios empleados para capacitar el semen, de las condiciones del laboratorio y de la habilidad del operador. En el caso de los bovinos, Parrish y colaboradores (1984) demostraron que los espermatozoides de toro podían capacitarse *in vitro* en un medio de fecundación-capacitación con heparina. Estudios

posteriores, establecieron que la concentración de heparina utilizada afecta la tasa de desarrollo embrionario posterior hasta el estadio de blastocisto (Parrish y col., 1985 a, b; 1988), que existe una concentración adecuada para la capacitación del semen de cada toro (Lancaster y col., 1990; Chung y col., 1991) y que el tiempo de incubación de los espermatozoides en el medio de capacitación es un factor determinante para lograr una FIV exitosa (Fukui y col., 1990). Por lo tanto, antes de iniciar los ensayos experimentales de la presente tesis doctoral se llevó a cabo la puesta a punto de la técnica de producción *in vitro* de embriones bovinos que se utilizó como modelo experimental durante el desarrollo del presente trabajo de tesis.

## Reactivos

Todos los reactivos fueron provistos por Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, EE.UU.), a menos que se indique lo contrario. Todos los medios y soluciones se prepararon con agua Tipo I (Sigma) y fueron almacenados a 4°C en oscuridad. La ghrelina acilada se adquirió de Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA (Catálogo # 031-30). La reconstitución y preparación de la solución de trabajo se detalla en la sección Apéndice 1 (Stock ghrelina).

## Obtención y procesamiento de las muestras

Los COC se obtuvieron a partir de ovarios de frigorífico extraídos de hembras jóvenes. Los ovarios se colocaron en solución fisiológica a 37-39°C y se mantuvieron en termos hasta llegar al laboratorio donde se lavaron tres veces en solución fisiológica esteril. De cada ovario se aspiraron los folículos de 3-8 mm usando una aguja de 18 G conectada a

un tubo estéril y a una línea de vacío (50 mm Hg). La búsqueda de los COC se realizó con un microscopio estereoscópico a menor aumento (20X) y luego, se colocaron en medio HEPES-199 + 10% SFB (medio de mantenimiento). Para la maduración *in vitro* (MIV), se eligieron los COC cuyos ovocitos presentaron el citoplasma homogéneo y las CC compactas. Los COC se lavaron dos veces en medio de MIV, se tomaron grupos de 10 COC en 10 µl de medio, se sembraron bajo aceite mineral en gotas de 40 µl de medio de MIV con diferentes concentraciones de ghrelina. Se incubaron durante 24 h a 39°C en atmósfera gaseada con 5% CO<sub>2</sub> en aire y humedad a saturación. Las distintas concentraciones de ghrelina empleadas se definieron de acuerdo al trabajo de Miura y col, (2004), que midieron en vacas lecheras los cambios en la concentración plasmática de la hormona durante el día, en relación a la ingesta de alimento. La ghrelina fue agregada al medio de MIV de modo de alcanzar las siguientes concentraciones: 20 pM, 40 pM y 60 pM. También se trabajó con un tratamiento Control sin suplementar (0 pM de ghrelina). Para evaluar la expansión del *cumulus* antes y después de la MIV, se colectaron COC inmaduros (T0) y COC luego de 24 h de MIV con los *cumulus* ya expandidos (T24) correspondientes al control y a las distintas concentraciones de ghrelina (0, 20, 40 y 60 pM). Tanto los COC inmaduros como los madurados *in vitro* fueron disgregados mecánicamente con pipeta fina en medio mantenimiento para separar las CC de los ovocitos. Las muestras con CC o con ovocitos (40 ovocitos por tratamiento) fueron identificadas y transferidas a tubos de 1,5 ml libres de ARNasas conteniendo TRIzol® (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.). Las muestras se conservaron a -80 °C hasta ser procesadas.

## Extracción de ARN

El ARN de ovocitos y CC fue extraído utilizando el reactivo TRIzol® (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.) según las recomendaciones del fabricante. El ARN obtenido fue digerido con ADNasa I (Qiagen, Hilden, Alemania) para eliminar ADN genómico contaminante. La digestión se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl. La calidad y cantidad del ARN de las muestras se analizaron usando un espectrofotómetro (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). La retrotranscripción se realizó mediante la enzima MMLV (Invitrogen Corp.) a partir de 10 µl del ARN tratado con ADNasa en un volumen final de 20 µl. En todas las reacciones de retrotranscripción se procesó un control sin ARN y un control negativo de retrotranscripción sin la enzima retrotranscriptasa.

Se diseñaron primers para estudiar los niveles de expresión de ARNm de ghrelina y su receptor GHS-R1a utilizando el software Primer Premier (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, EE.UU.). Se seleccionaron aquellos pares de primers que presentaban una temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) similar, contenido de GC intermedio (40-60%) y la menor complementariedad de secuencia, para minimizar la formación de estructuras secundarias y dímeros de primer. La secuencia de los primers diseñados y el tamaño del amplicón que generan a partir del ADN complementario o ADN copia (ADNc) figuran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Primers utilizados en este estudio, secuencias, temperatura de annealing y longitud del producto de la PCR.

Genes	Secuencias	T° annealing	Producto (pb)
GHS-R1a	Forward 5' ACAGACCGTGAAGATGCT 3'	60°C	164
GHS-R1a	Reverse 5' GGTAGAAGAGGACGAAAGA 3'	60°C	164
GHRELINA	Forward 5' CTGAAGAAA CCCTGGCTAAC 3'	57°C	107
GHRELINA	Reverse 5' CGTGGTCTCGGAAGTGTC 3'	57°C	107
GAPDH	Forward 5' TTCTGGCAAAGTGGACATCGT 3'	60°C	112
GAPDH	Reverse 5' CTTGACTGTGCCGTTGAAGTTG 3'	60°C	112

### Amplificación por PCR convencional

Antes de realizar los estudios de expresión génica por PCR en tiempo real (qRT-PCR) los pares de primers fueron testeados por PCR convencional con ADNc extraído del tejido de los COC, abomaso e hipotálamo bovino. Para realizar el protocolo de PCR se trabajó con concentraciones finales de: 1X Buffer PCR, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido (dNTP), 1,5 mM de cloruro de magnesio, 0,5 µM de cada “*primer*” y 2 unidades de enzima ADN polimerasa (Invitrogen Corp.). Se utilizó como templado 1 µl de ADNc y se llevó a un volumen final de 20 µl con agua grado biología molecular. El protocolo de amplificación del ADN se realizó en 35 ciclos (40 segundos a 94°C, 40 segundos a 60°C, 40 segundos a 72°C) y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR fueron analizados empleando electroforesis en geles de agarosa al 2,5% y seguidos de tinción con una solución 0,5 µg/ml de bromuro de etidio en buffer TBE 1X y visualizados en un transiluminador U.V. Para todos los pares de primers se corroboró que los negativos

de retrotranscripción (sin retrotranscriptasa) no presentaran producto de PCR y que en todas las reacciones se amplificará el producto del peso molecular esperado.

### Ensayos de PCR en tiempo real (qrt-PCR)

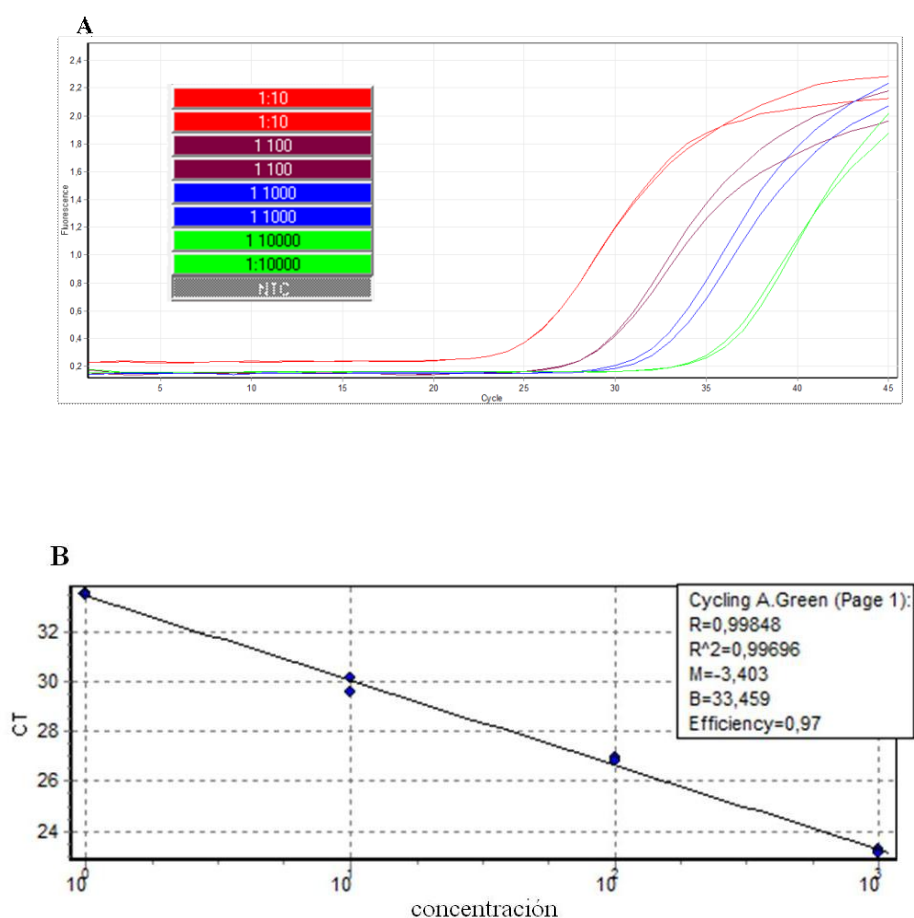
Una vez corroborado el diseño y protocolo de amplificación de los diferentes pares de primers por PCR convencional, se efectuaron por qrt-PCR curvas de rango dinámico para cada par de primers, con el fin de calcular las eficiencias de amplificación. Se realizaron amplificaciones por duplicado de un ADNc obtenido de tejido de abomaso, de ovocitos y CC, en diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. En todos los ensayos, las curvas de calibración tuvieron una pendiente entre -3,2 y -3,5 y entre los duplicados, la desviación estándar fue en todos los casos  $< 0,167$  según lo recomendado para realizar estudios de expresión génica relativos (Bustin, 2002).

Para determinar el rango dinámico de amplificación del ARNm de ghrelina, se realizaron diluciones seriadas de una reacción de retrotranscripción de 20  $\mu$ l de volumen final donde se utilizó 1  $\mu$ g de ARN total de la muestra. Como resultado de este análisis, se determinó que la pendiente de la recta, para el gen de ghrelina estudiado, se aproxima al valor teórico esperado de -3,33. En la figura 2.1 (a y b) se muestran los gráficos y los pasos seguidos en la puesta a punto de la qrt-PCR para la detección del transcripto de ghrelina. La curva de rango dinámico realizada para el gen de ghrelina se presenta en la Figura 2.1a.

El ADNc de ovocitos y CC se sometieron a ensayos de qrt-PCR utilizando Eva Green como colorante intercalante (KAPA RÁPIDO, Biosystems, Woburn, EE.UU.). La qrt-PCR se realizó en un termociclador Rotor Gene Q (Qiagen). El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 94 °C y 1 minuto a 60 °C. Después de la amplificación, se realizó un análisis



de la curva de melting que dio lugar a la curva de melting específica para un único producto. En todos los casos, los experimentos se realizaron por duplicado. Los controles negativos para la síntesis de ADNc y para la PCR fueron incluidos en todos los casos. Los valores relativos de expresión se calcularon por el método 2 delta-delta CT (Livak y Schmittgen, 2001). Cada uno de los genes se analizó por separado, y fueron normalizados al control interno GAPDH.



**Figura 2.1** Optimización del ensayo de PCR en tiempo real del gen de ghrelina. **(A)** Registro de una curva de rango dinámico en una puesta a punto del ensayo de PCR en tiempo real para medición de niveles de ARNm de ghrelina. Protocolo empleando como molde diluciones seriadas de ADNc de abomaso generado mediante la retrotranscripción de 1 µg de ARN total. El registro se presenta en el formato de un gráfico de aumento de

fluorescencia (Delta Rn) graficada en función del número de ciclos. **(B)** Representación gráfica de los valores de Ct (número de ciclo) versus el logaritmo de la concentración inicial (Log CO) del ADNc molde. A la derecha se puede observar el valor de la pendiente, la cual nos permite conocer la eficiencia de la reacción (97%).

### Validación del gen housekeeping

Con el fin de establecer si el gen endógeno seleccionado era apto para utilizarlo en los estudios de expresión génica, se estudiaron los niveles de expresión de GAPDH en las muestras de COC y los controles positivos para ghrelina (tejido de abomaso bovino) y para GHS-R1a (hipotálamo de bovino).

Se efectuó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis para comparar los diferentes grupos, no encontrándose diferencias significativas en los valores de Ct de GAPDH entre los mismos. De este modo, se validó la utilización de GAPDH como gen housekeeping para los estudios de expresión génica.

### Análisis de la expresión de ARNm

A partir del presente ensayo se logró cuantificar la concentración de ARNm de ghrelina, tanto en ovocitos como en las CC. Sin embargo, debido a la escasa cantidad de datos obtenidos (dos réplicas incompletas), fue necesario agrupar los tratamientos para poder realizar el análisis estadístico de los mismos. Por lo tanto, quedaron constituidos tres tratamientos; Tratamiento 1: Inmaduros (T0), Tratamiento 2: madurados con “baja” concentración de ghrelina (0 y 20 pM) y Tratamiento 3: madurados con “alta” concentración de ghrelina (40 y 60 pM) (Figura 2.2).

Con respecto al receptor GHS-R1a no fue posible cuantificar la expresión de ARNm dado los bajos niveles de expresión y la escasa cantidad de muestras (dos réplicas

incompletas). Por esta razón, solo se pudo determinar si el transcripto estaba o no presente, tanto en el ovocito como en las CC. Por tal motivo los datos fueron analizados estadísticamente utilizando un test para variables categóricas: “detectado - no detectado” (Tabla 2.2 y 2.3). Para poder realizar el análisis estadístico fue necesario agrupar los distintos tratamientos en dos; Tratamiento 1: cultivados en ausencia de ghrelina (0 pM ghrelina) y Tratamiento 2: incluye las células cultivadas 24 h con 20, 40 y 60 pM de Ghrelina. De esta forma evaluamos un posible patrón diferencial de expresión del receptor GHS-R1a cuando ghrelina se encuentra presente o no en el medio.

### Análisis Estadístico

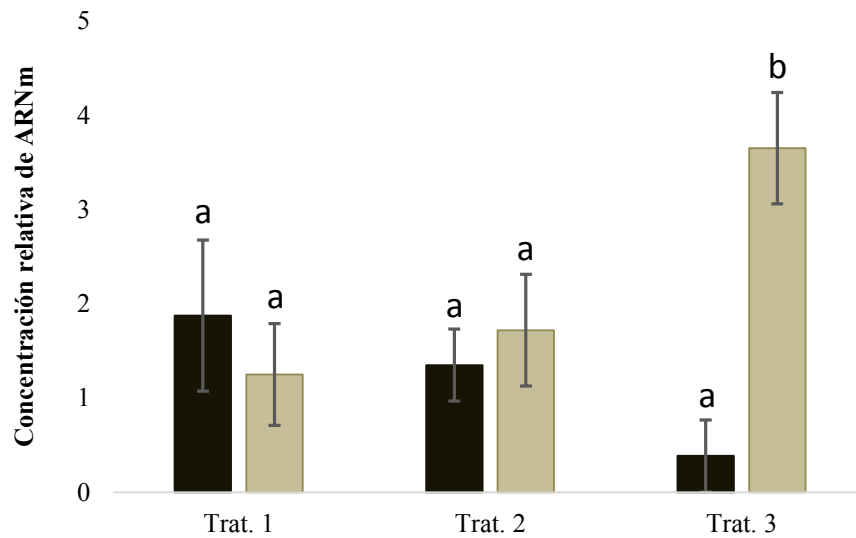
Para el análisis estadístico se utilizó un diseño experimental en bloques completamente aleatorio. El análisis estadístico de la concentración de ARNm de ghrelina se realizó utilizando un arreglo 2 X 3 factoriales mediante una regresión lineal mixta con el procedimiento MIXED de SAS 9.4 (SAS Inst Inc.). El modelo incluyó el efecto aleatorio del bloque [Tratamiento 1 (inmaduros; T0) vs. Tratamiento 2 (madurados con 0 y 20 pM) vs. Tratamiento 3 (madurados con 40 y 60 pM ghrelina)], del tipo celular (ovocitos vs. CC) y la interacción (tratamiento por tipo celular). El análisis estadístico de la variable categórica (“Presente” – “No presente”) se realizó mediante el test de chi-cuadrado con el procedimiento GLIMMIX de SAS 9.4 (SAS Inst. Inc.). Se utilizó una distribución Binomial y un enlace Logit. El modelo incluyó los efectos del tratamiento [madurados sin ghrelina (0 pM) vs. madurados con ghrelina (20+40+60 pM ghrelina)]. Las variables continuas se expresan como el promedio  $\pm$  ESM. Las variables categóricas están expresadas como porcentaje. Se consideraron efectos significativos a las  $p < 0,05$  y tendencias a las  $p < 0,10$  y  $p > 0,05$ .

## Resultados

Expresión de la hormona ghrelina y su receptor (GHS-R1a) en los ovocitos y las células del *cumulus* bovino.

En el *Experimento 1*, mediante RT-PCR, se analizaron los niveles de expresión del ARNm de ghrelina en células del *cumulus* (CC) y ovocitos. Los niveles de expresión relativa de ghrelina en CC fueron superiores en el Tratamiento 3 (3,65) comparado con los Tratamiento 1 y 2 (1,25 y 1,72 respectivamente), y fue similar entre los Tratamiento 1 y 2. Por otro lado, si bien los ovocitos presentaron un comportamiento opuesto, los niveles de expresión relativa de ghrelina fueron similares entre los Tratamientos (Figura 2.2).

Para el caso del receptor GHS-R1a los resultados obtenidos mostraron que tanto en las CC como en los ovocitos que se maduraron sin agregado de ghrelina al medio (T0 y Control), el ARNm del receptor GHS-R1a no fue detectado (Tabla 2.2). En el caso de las CC y los ovocitos tratados con ghrelina, el ARNm del receptor GHS-R1a estaba presente en ambas células (Tabla 2.2). Esto último pone de manifiesto que el tratamiento con ghrelina induce la expresión de GHS-R1a, aunque no fue posible determinar en qué medida. El riesgo de presencia de expresión de GHS-R1a en función de la suplementación con ghrelina en ovocitos y CC aparecen en la Tabla 2.3.



**Figura 2.2** Niveles relativos de expresión del ARNm de ghrelina en ovocitos y CC. **O**= ovocitos (barras negras); **CC**= células del *cumulus* (barras grises). **Trat. 1**: Inmaduros (T0), **Trat. 2**: madurados con “baja” concentración de ghrelina (0 y 20 pM) y **Trat. 3**: madurados con “alta” concentración de ghrelina (40 y 60 pM). (<sup>a, b</sup>) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Se analizaron un total de 400 COCs, 80 COCs por tratamiento en 2 repeticiones en días distintos.

**Tabla 2.2** Expresión del ARNm de GHS-R1a en ovocitos y CC. Los COCs fueron madurados 24 h con 0, 20, 40 y 60 pM de ghrelina.

	ARNm de GHS-R1a	
	Ovocitos	CC
<b>T0 (inmaduros)</b>	no detectado	no detectado
<b>Control</b>	no detectado	no detectado
<b>20pM</b>	detectado	detectado
<b>40pM</b>	detectado	detectado
<b>60pM</b>	detectado	detectado

**Tabla 2.3** Riesgo de presencia de expresión de GHS-R1a en función de la suplementación con ghrelina (suplementado vs. no suplementado).

Células	Trt	Receptor		
		Ausente	Presente	Total
CC	- ghrelina	(n=1) 100%	(n=0) 0%	(n=1) 16,67%
	+ ghrelina	(n=1) 20%	(n=4) 80%	(n=5) 83,33%
	Total	33,33% (n=2)	66,67% (n=4)	100% (n=6)
OV	- ghrelina	(n=2) 100%	(n=0) 0%	(n=2) 25%
	+ ghrelina	(n=3) 50%	(n=3) 50%	(n=6) 75%
	Total	62,5% (n=5)	37,5% (n=3)	100% (n=8)
CC+OV	- ghrelina	(n=3) 100%	(n=0) 0%	(n=3) 21,43%
	+ ghrelina	(n=4) 36,36%	(n=7) 63,64%	(n=11) 78,57%
	Total	50% (n=7)	50% (n=7)	100% (n=14)

**Trt:** tratamiento, **CC:** células del *cumulus*, **OV:** ovocitos. **- ghrelina:** madurados 24 h con 0 pM de ghrelina. **+ ghrelina:** incluye las células maduras por 24 h con 20, 40 y 60 pM de ghrelina. **CC:** Riesgo de presencia de GHS-R1a en función de la suplementación con ghrelina sobre las células del *cumulus*. **OV:** Riesgo de presencia de GHS-R1a en función de la suplementación con ghrelina sobre ovocitos. **CC+OV:** Riesgo de presencia de GHS-R1a en función de la suplementación con ghrelina sobre las células del *cumulus* y ovocitos.

Al evaluar el riesgo de presencia de expresión de GHS-R1a en función de la suplementación con ghrelina, no se encontraron diferencias significativas cuando se

evaluó el efecto de la hormona durante la MIV en CC (porcentaje de muestras que expresaron GHS-R1a en ausencia de ghrelina: 0%; porcentaje de muestras que expresaron GHS-R1a en presencia de ghrelina 80%;  $p=0,1213$ ). Tampoco se encontró diferencias significativas cuando se evaluó el efecto de la presencia o ausencia de ghrelina durante la MIV en ovocitos (porcentaje de muestras que expresaron GHS-R1a en ausencia de ghrelina: 0%; porcentaje de muestras que expresaron GHS-R1a en presencia de ghrelina 50%; ( $p=0,2059$ ). Sin embargo, cuando se evaluó el COC completo (CC+OV) sin el agregado de ghrelina y con el agregado de ghrelina al medio de MIV (20, 40 y 60 pM), se observó que cuando ghrelina no estuvo presente en el medio de MIV el porcentaje de muestras que expresaron GHS-R1a fue significativamente menor (0%) respecto a aquellos que lo hicieron en presencia del péptido (63,64%;  $p=0,050$ ) (Tabla 2.3).

## Discusión y conclusiones

Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en la investigación de ghrelina, su receptor GHS-R1a y su relación con los tejidos reproductivos en rata, humanos, ovinos y porcinos (Caminos y col., 2003b; Gaytan y col, 2003; Du y col, 2009; Rak-mardyla y col., 2009, 2012), muy pocos han investigado sobre la presencia de ghrelina, su receptor, y su función en la especie bovina. Si bien la ghrelina y su receptor GHS-R1a se han identificado en algunas partes del tracto reproductivo de la vaca (Deaver y col., 2013), hasta el momento no se había descrito en el complejo ovocito-*cumulus* (COC) de bovino. El presente estudio proporciona evidencias, por primera vez, de la expresión del ARNm de

ghrelina y su receptor GHR1a tanto en el ovocito como en las células del *cumulus* (CC) que lo rodean. Los resultados obtenidos respecto a ghrelina mostraron que la hormona se expresa en ovocitos y CC tanto antes como después de la MIV. Por otro lado, el receptor GHS-R1a solo fue detectado cuando ghrelina fue añadida al medio de MIV. Evidentemente la presencia de ghrelina en el medio podría estar estimulando la expresión de su receptor. Esto concuerda con lo reportado por Wang y col, (2013) donde observaron que diferentes concentraciones de ghrelina adicionadas al medio de MIV aumentaban la expresión del receptor GHS-R1a, en la especie ovina.

En un trabajo realizado por Deaver y col., (2013) se ha descrito la expresión e inmunolocalización del péptido ghrelina y su receptor GHS-R1a en el tracto reproductivo bovino, pero solo llegaron a evaluar hasta el folículo (células de la teca y la granulosa) y el cuerpo lúteo (células luteales pequeñas y grandes). Un dato interesante en este trabajo, con respecto a la amplificación del ARNm de GHS-R1a fue que, si bien estaba presente en todos los tipos de tejidos del tracto reproductivo evaluados, en varios de ellos (cuerno uterino, folículos y cuerpo lúteo) los niveles de expresión eran muy bajos. Si bien no se define la cantidad de muestra con la que se realizó el estudio de expresión génica, este dato de los bajos niveles de expresión de GHS-R1a en esas estructuras, podrían explicar en parte la dificultad que encontramos al cuantificar el receptor GHS-R1a en las muestras de ovocitos y CC, posiblemente por el tamaño de la muestra y la baja expresión en estas estructuras.

Estudios previos han demostrado la expresión de la ghrelina y su receptor GHS-R1a en el tracto reproductivo de seres humanos y otras especies. En humanos, la determinación inmunohistoquímica y expresión del péptido ghrelina y GHS-R1a se demostró en las células de la granulosa y de la teca del folículo antral, y también en el cuerpo lúteo (Gaytan



y col., 2003). Del mismo modo, un estudio realizado en ratas demostró la expresión del péptido ghrelina en el ovario, y puso de manifiesto que el cuerpo lúteo funcional es el sitio principal para la expresión de ghrelina (Caminos y col., 2003b). En la especie porcina se demostró la expresión de ghrelina y su receptor GHS-R1a en los folículos ováricos de hembras durante el ciclo estral y la pubertad (Rak-mardyla y col., 2009, 2012). Por otro lado, el grupo de Du y col. (2009) determinó, en la especie ovina, la inmunolocalización y la expresión del ARNm de ghrelina en ovocitos, células del *cumulus* y las células de la granulosa y la teca del folículo ovárico. Un dato interesante, reportado por este grupo, se observa en los niveles de expresión relativos de la hormona ghrelina, donde no se encontraron diferencias entre las estructuras analizadas (ovocitos, CC y las células de la granulosa y la teca). Posiblemente esto pueda estar relacionado a que se utilizaron ovocitos inmaduros obtenidos de la punción de los folículos y a su vez parte de las células del mismo folículo. Estos hallazgos difieren a los observados en el presente trabajo de tesis, donde se registró un comportamiento diferente en los patrones de expresión de la hormona. En el presente trabajo de tesis no solo se evaluaron COCs inmaduros, sino que también COCs que fueron madurados con diferentes concentraciones de la hormona (20, 40 y 60 pM). Una observación interesante fue que en las CC tratadas con la hormona aumentó la expresión del ARNm de ghrelina conforme aumentó la concentración en el medio. Por otro lado, los ovocitos presentaron un patrón de comportamiento diferente (numéricamente pero no estadísticamente), ya que al incrementarse la concentración de la hormona en el medio, la expresión de ésta disminuía. Esto sugiere que la presencia de ghrelina en el microambiente que rodea al COC podría tener un efecto autocrino/paracrino.

Si bien es un gran avance el haber identificado ARNm que codifica para ghrelina, tanto en ovocitos como en las CC, se nos generan algunos interrogantes. Así como la

mayoría de las hormonas, la ghrelina presenta una serie de modificación postraduccionales que dan como resultado la forma madura de la hormona (Kojima y col., 1999). A su vez, el ARNm de la ghrelina que codifica para su precursor (preproghrelina), también da origen a otro péptido denominado obestatina (Zhang y col., 2005), es decir que la obestatina proviene del mismo gen que la ghrelina. La obestatina tiene efectos opuestos a los de ghrelina, ya que tiene la capacidad de inhibir la ingesta y disminuir el peso corporal, el vaciamiento gástrico y la motilidad intestinal (Zhang y col., 2005). Esto nos lleva a pensar en lo complejo de esta regulación, sabiendo que un mismo gen tiene la capacidad de generar dos hormonas con acciones opuestas. Se sabe que el ovocito es capaz de controlar el desarrollo de las células somáticas que lo rodean y de esta manera puede regular activamente su propio microambiente, alterando la expresión de factores paracrinós secretados por los ovocitos (Gilchrist y col., 2008). Quizás la regulación de la expresión génica, la síntesis y la actividad de ambas hormonas dependan de una compleja interacción entre señales intra y/o extracelulares, dependiendo de la situación fisiológica particular de cada célula.

Al parecer, en la ghrelina las modificaciones postraduccionales juegan un papel importante. Otro aspecto interesante es que, el gen de la ghrelina da lugar a diferentes formas de la hormona de las cuales las más abundantes son la forma acilada y la desacilada. La ghrelina acilada lleva unida a su molécula un ácido graso de ocho carbonos (n-octanoico), mientras que la ghrelina desacilada no lo posee (Kojima y col., 1999). El proceso de acilación lo realiza la enzima ghrelina O-aciltransferasa (GOAT), (Yang y col., 2008). Si bien se sabe que esta acilación es esencial para la unión al receptor GHS-R1a y por lo tanto para su actividad biológica, también se describió que la forma desacilada tiene una serie de efectos, pero mediados por un receptor distinto al GHS-R1a (Delhanty y col.,

2006). Esto nos plantea el interrogante de saber qué forma de ghrelina es la que está presente en los COCs, o quizás posiblemente estén ambas y a través de algún mecanismo mediado por la enzima GOAT se regule la producción de una u otra. Mediante estudios de inmunohistoquímica se ha demostrado que existe colocalización entre GOAT y ghrelina, sugiriendo que esta acilación se podría producir en las mismas células donde se sintetiza la ghrelina (Sakata y col., 2009). Por otra parte, se observó que la GOAT se expresa en cantidades variables en diferentes tejidos, incluyendo al ovario (Gutiérrez y col., 2008, Yang y col., 2008; Sakata y col., 2009). Quizás valorar la expresión de esta enzima, podría ser una forma de determinar qué tipo de ghrelina se está produciendo en la célula.

A diferencia de lo que se creía en un principio, el hallazgo de este amplio patrón de expresión de ghrelina y su receptor en el tracto reproductivo en las diferentes especies, y particularmente en el COC, lleva a pensar que este sistema de señalización podría estar involucrado en la regulación local de la función reproductiva. Si bien algunos de los trabajos antes citados investigaron la presencia de ghrelina y GHS-R1a en diferentes estructuras ováricas de diferentes especies, hasta el momento no hay trabajos publicados que describan la expresión de la hormona ghrelina y su receptor en el complejo ovocito-*cumulus* (COC) bovino. Este hallazgo es un primer paso obligatorio hacia la comprensión del papel de la ghrelina en la regulación de la función reproductiva en el bovino.

## **Capítulo 3**

### **EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GHRELINA SOBRE LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE LOS OVOCITOS BOVINOS**

## Introducción

Los ovocitos de mamíferos tienen la capacidad de madurar espontáneamente hasta el estadio de MII cuando son liberados desde un folículo antral y cuando son cultivados *in vitro*, lo que se denomina maduración *in vitro* (MIV) (Pincus y Enzmann, 1935; Masui y Clark, 1979; Wassarman y col., 1979; Eppig, 1985, 1991). La maduración del ovocito se define generalmente como el período comprendido entre el primer y segundo arresto meiótico, e implica modificaciones nucleares y citoplasmáticas coordinadas (Tosti, 2006). Estas modificaciones son el resultado de procesos altamente complejos regulados por una serie de eventos moleculares secuenciales (Whitaker y Patel, 1990; Masui, 1996; Whitaker, 1996). Este es un proceso largo durante el cual los ovocitos adquieren la capacidad intrínseca de avanzar a través de las etapas subsiguientes del desarrollo, e implica tanto la maduración nuclear como la maduración citoplasmática del mismo, acompañada de la expansión y mucificación de las células del *cumulus* (Eppig, 1982; Fulka y col., 1998; Ferreira y col., 2009). Estos dos eventos (la maduración nuclear y la citoplasmática) ocurren simultáneamente y en forma interconectada. La maduración nuclear involucra la reanudación de la meiosis y el progreso a metafase II (MII) (Lin y Hwang., 2006), y se caracteriza por la disolución de la membrana nuclear (vesícula germinal), la condensación de la cromatina formando cromosomas bivalentes distinguibles, la separación de los cromosomas homólogos, la emisión del primer cuerpo polar, y la detención en metafase II hasta el momento de la fecundación (Evans y Robinson, 2011). Por otra parte, la maduración citoplasmática es un proceso menos comprendido e involucra a la maduración molecular (Ferreira y col., 2009). Durante este fenómeno, gran cantidad del ARNm acumulado durante la fase de crecimiento del ovocito será utilizado en la síntesis de proteínas y moléculas reguladoras que intervienen tanto en la maduración del ovocito

como en los eventos subsiguientes de la fecundación, la formación de pronúcleos y las primeras etapas del desarrollo embrionario (Eppig y Wigglesworth, 2000; Vanhoutte, 2009). Por lo tanto, la sincronización de estos dos procesos asegura una normal fertilización y desarrollo embrionario (Liu y col., 2010).

Durante el curso de la foliculogénesis, al final de la fase de crecimiento ovocitario, las células de la granulosa se dividen en dos linajes que se diferencian estructural y funcionalmente: las células de la granulosa mural, que forman la pared del folículo, y las células del *cumulus* (CC). Estas últimas se encuentran en íntimo contacto metabólico con el ovocito, a través de proyecciones citoplasmáticas transzonales que forman *gap junction* conformando el complejo ovocito-*cumulus* (COC) (Gilchrist y col., 2008). A través de estas uniones los ovocitos se mantienen unidos física y metabólicamente a las CC, facilitando la transferencia de pequeñas moléculas como nutrientes y moléculas mensajeras en ambas direcciones.

El COC presente en el folículo antral de los mamíferos, constituye una unidad estructural y funcional (Camaioni y col., 1993). Como consecuencia del aumento de gonadotrofinas endógenas durante el período preovulatorio, el espacio entre las células del *cumulus* aumenta debido a la producción de una matriz extracelular rica en ácido hialurónico (AH). Este proceso, llamado expansión o mucificación, facilita el desprendimiento del COC de la pared del folículo, su extrusión en la ovulación, y su captura por las fimbrias del oviducto. Además, las CC y la matriz extracelular del COC expandido, mejoran la penetración del espermatozoide y la fecundación. La expansión óptima de la masa del *cumulus* es, por lo tanto, fundamental para la correcta ovulación y posterior fecundación del ovocito (Camaioni y col., 1993; Borg y Holland, 2008; Nagyova

y col., 2012). Chen y colaboradores (1993) demostraron que el grado de expansión del *cumulus* se correlaciona con la tasa de desarrollo del huevo hasta el estadio de 2 células.

La ghrelina, más allá de su papel metabólico, se considera hoy en día como un importante regulador de la función reproductiva de los mamíferos, actuando tanto a nivel central (Tena-Sempere, 2008) como gonadal (Dupont y col., 2010). Estudios previos han demostrado que concentraciones altas de ghrelina, que en algunos casos fueron suprafisiológicas, afectaron negativamente la maduración de ovocitos (Suzuki y col., 2010; Dovolou y col., 2014a). Sin embargo, Dashtizad y colaboradores (2011) reportaron un aumento en la tasa de ovocitos bovinos que alcanzaron la metafase II cuando se maduraron con concentraciones bajas de ghrelina. Por otra parte, se demostró que la suplementación con ghrelina mejoraba el grado de expansión del *cumulus* de los COC bovinos (Dovolou y col., 2014a). Así también, otro ensayo realizado en la misma especie reportó que la adición de ghrelina en el medio de MIV no afectó la maduración de los ovocitos (Popelkova y col., 2006).

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es un proceso altamente regulado y crucial en todos los organismos multicelulares (Rana, 2008). Las células apoptóticas sufren una serie de alteraciones morfológicas y bioquímicas características, incluyendo condensación de la cromatina, compactación de las organelas citoplasmáticas, cambios en la simetría de la membrana y fragmentación del ADN (Kerr y col., 1972; DeLong, 1998; Chandra y col., 2000). Como consecuencia de estos cambios, se forman estructuras celulares envueltas en membrana plasmática llamadas “cuerpos apoptóticos” que son expulsados al espacio extracelular (DeLong, 1998). El proceso de apoptosis también implica la activación de una cascada de proteasas denominadas caspasas que son responsables de degradar sustratos celulares específicos y que llevan a la muerte

celular (Hampton y Orrenius, 1997; Chandra y col., 2000). La apoptosis ocurre cuando el daño celular, incluyendo el daño en el material genético, ha sobrepasado la capacidad de reparación de la célula (Rana, 2008). El daño en el ADN puede ser el producto final del fenómeno de apoptosis o uno de los responsables de su desarrollo (Norbury y Zhivotovsky, 2004; Rana, 2008; Song y col., 2009). Si bien se ha demostrado, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, que las células de la granulosa mueren a través del proceso activo de apoptosis (Hughes y Gorospe, 1991; Tilly y col., 1991; Luciano y col., 2000), la información sobre este fenómeno en células del *cumulus* durante la MIV es todavía limitada (Dieci y col., 2016). Diversos autores han encontrado una relación inversa entre la tasa de apoptosis de las CC que rodean al ovocito y su capacidad de desarrollo posterior (Lee y col., 2001; Host y col., 2002; Ikeda y col., 2003).

La ghrelina presenta efectos diversos sobre la proliferación celular. Dependiendo del tipo de célula, se ha observado que la ghrelina puede actuar tanto inhibiendo (Ghe y col., 2002; Volante y col., 2003; Barreiro y col., 2004) como estimulando la proliferación celular (Kim y col., 2004, 2005; Tian y col., 2012; Li y col., 2014). Se ha estudiado que en la ruta metabólica de ghrelina que regula la proliferación celular, están implicados los mediadores PI3-cinasa, Akt y MAPK (Waseem y col., 2014). Por otra parte, se ha observado que ghrelina promueve la proliferación celular a través de mecanismos que inhiben la apoptosis (Rak-Mardyła y col., 2010a, 2010b; Liang y col., 2013). De forma controversial, la ghrelina puede actuar como un factor antiapoptótico o proapoptótico dependiendo el tipo de célula (Bonfili y col., 2013; Lee y col., 2016).

La hipótesis que se pretende demostrar es que ghrelina afecta negativamente la maduración de los ovocitos bovinos. En consecuencia, se diseñaron una serie de experimentos para estudiar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de ghrelina



al medio de MIV sobre: 1) la expansión y el número de CC de ovocitos bovinos; 2) la maduración nuclear de los ovocitos; 3) la viabilidad de los ovocitos y sus CC; 4) la tasa de apoptosis de las CC y 5) la integridad del ADN de las CC.

## **Material y métodos**

### **Coloración fluorescente para núcleos (HOESCHT 33342)**

Para la tinción fluorescente de núcleos se preparó una solución stock diluyendo 10 mg de Hoescht 33342 en 20 ml de etanol proanálisis (500 µg/ml). Para la solución de trabajo se tomó 0,2 ml de la solución stock y se le agregó 9,8 ml de glicerol. Los ovocitos o embriones se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente en la solución de trabajo, se montaron entre porta y cubreobjeto bajo lupa y, se evaluaron con microscopio de epifluorescencia (Filtro UV A).

### **Complejos Ovocito-*Cumulus* (COC)**

Los ovarios bovinos fueron obtenidos a partir de hembras de frigorífico, independientemente del estado del ciclo estral y transportados al laboratorio en solución fisiológica estéril a 37°C, dentro de las 3 horas de realizada la extracción. Los COC fueron aspirados de folículos de 3 a 8 mm de diámetro, utilizando una aguja 18 G conectada a un tubo estéril y a una línea de vacío (50 mm Hg). Solamente fueron seleccionados para la MIV, aquellos COC que presentaron el *cumulus* intacto y el citoplasma homogéneo. Para la selección, se utilizó un estereomicroscopio con bajo aumento (20 - 30 X). Las

repeticiones de cada experimento (n= 4/5) se realizaron en días diferentes y en cada día se obtuvieron 200 COC, utilizando 50 COC por tratamiento.

### Maduración *in vitro* (MIV)

Los COC fueron lavados 2 veces en medio TCM-199 con 15 mM de HEPES (ver anexo) suplementado con 10 % (v/v) de SFB. Luego se lavaron 2 veces en medio de MIV (TCM-199 suplementado con SFB, FSH y LH). Para la maduración se tomaron grupos de 10 COC y se transfirieron a microgotas de 50  $\mu$ l de medio de MIV bajo aceite mineral (Squibb, Princeton, NJ, USA) previamente equilibradas en atmósfera gaseada al 5 % de CO<sub>2</sub>, a 39 °C y humedad a saturación por 24 h. Las distintas concentraciones de ghrelina empleadas (20 pM, 40 pM y 60 pM) se definieron de acuerdo al trabajo de Miura y col, (2004) (ver Capítulo 2). El medio Control corresponde al medio de MIV sin agregado de ghrelina (0 pM).

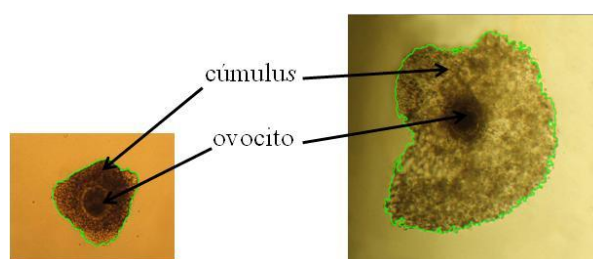
### *Preparación de cajas para MIV:*

Las cajas de Petri para MIV se preparan previamente a la recolección de los COC con gotas de 40  $\mu$ l de medio de maduración, cubiertas con aceite mineral. Posteriormente, las cajas de MIV se incuban durante 3 h a 39° C en atmósfera gaseada con 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad a saturación para equilibrar el pH (7,2-7,4) del medio. El volumen final de las gotas de MIV es de 50  $\mu$ l: 40  $\mu$ l de medio de MIV + 10  $\mu$ l con los COC.

### Evaluación de la expansión y el número de células del *cumulus*

Los COC fueron madurados en microgotas individuales de 10 $\mu$ l de volumen. El área de expansión del *cumulus* (AEC) de cada COC se midió antes (T0) y después de la MIV

(T24) mediante un sistema de captura y digitalización de imágenes (SONY-CCD) acoplado a un software de análisis de imágenes microscópicas (Image ProPlus® 3.1) que permite realizar mediciones de áreas irregulares (Figura 3.1). El sistema de unidades fue transformado a  $\mu\text{m}^2$  por calibración con una cámara Makler. Además, se determinó el número de células del *cumulus* por COC para cada grupo experimental. Para ello, los COC ya sean compactos (T0) o expandidos (T24), fueron disgregados mecánicamente para separar las CC por pipeteo bajo microscopio estereoscópico en medio HEPES-TCM-199. Las suspensiones celulares fueron transferidas a tubos Eppendorf y se determinó el número promedio de CC por COC con una cámara hemocitométrica.



**Figura 3.1** Medición del área de expansión del *cumulus*. Imagen microscópica (40 X) de un COC antes de la MIV (T0) izquierda y luego de 24 horas de MIV (derecha, *cumulus* expandido). La línea verde es trazada por el software (Image ProPlus® 3.1) y delimita el área del COC.

### Evaluación de la maduración nuclear

Después de la MIV los ovocitos fueron despojados de las células del *cumulus* que lo rodean, y luego se lavaron tres veces en PBS con 1% de polivinilpirrolidona (PVP) y se fijaron en formaldehído al 4%. Los ovocitos fueron colocados en 1% de Triton X-100 durante la noche, se tiñeron con Hoechst 33342, se montaron en portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos. La presencia de MII+CP (placa de metafase II + cuerpo polar) se

determinó en un microscopio de epifluorescencia con un objetivo 40 X (Nikon Optiphot, Tokio, Japón) equipado con un filtro de excitación de 365 nm, un filtro de barrera de 400 nm, y un filtro de emisión de 400 nm (Furnus y col, 2008).

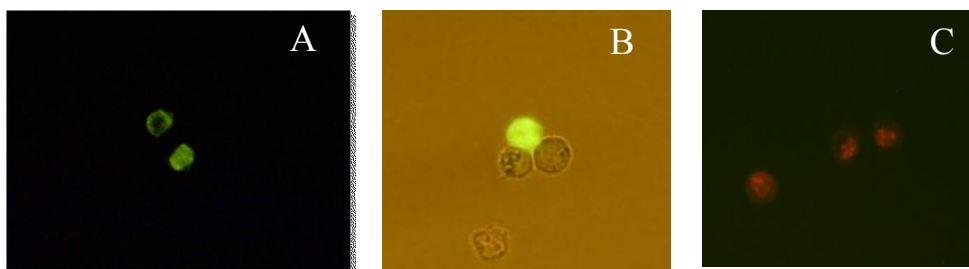
### Evaluación de la viabilidad

Se analizó la viabilidad tanto de los ovocitos y como de las CC incubando las muestras en una solución de diacetato de fluoresceína (FDA) 0,25  $\mu$ g (m/v) con el agregado de 2,5 mg/ml Trypan Blue (TB) en PBS a 37°C durante 15 minutos. La evaluación se realizó con microscopio de epifluorescencia. Las células vivas presentaron fluorescencia verde debido a la presencia de esterasas intracelulares activas, mientras que las células muertas no presentaron fluorescencia y se tiñeron de azul por el TB.

### Ensayo de apoptosis (Anexina V)

La Anexina V es una proteína que se une a fosfolípidos dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  con una gran afinidad por la fosfatidilserina (PS). La PS usualmente se ubica en el interior de la membrana plasmática. Cuando la célula sufre apoptosis, la PS se redistribuye quedando expuesta en la superficie externa de la célula (Glander y Schaller 1999; Paasch y col., 2004). Luego de la MIV la tasa de apoptosis temprana fue evaluada en CC utilizando Anexina V-FICT (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). La prueba involucra la tinción simultánea con Anexina V-FICT (verde) y el colorante de ADN, ioduro de propidio (IP, rojo). Las células normales observadas al microscopio no presentan ninguna de las dos tinciones. Las células apoptóticas son visibles en color verde y pueden ser diferenciadas de las células necróticas por la tinción con IP (se tiñen de rojo) (Figura 3.2 a, b y c). Las muestras ( $1 \times 10^6$  CC) fueron lavadas dos veces con PBS y centrifugadas a 200 g por 5

min. Luego el pellet fue resuspendido en 100  $\mu$ l de solución de marcado (Anexina V-FICT, *buffer* de HEPES y ioduro de propidio), e incubado en oscuridad durante 15 min a 20 °C.

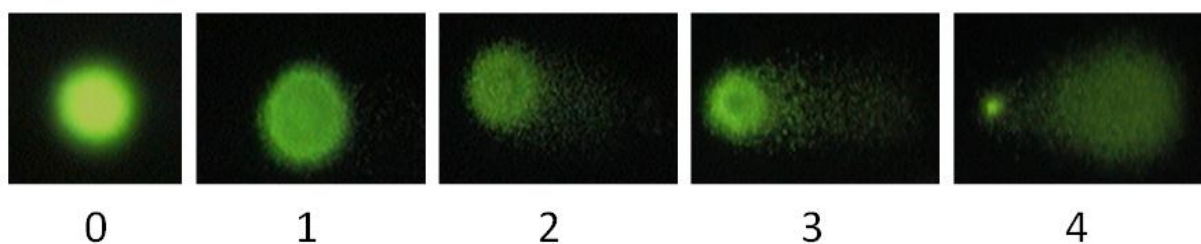


**Figura 3.2** Imagen tomada con microscopio de fluorescencia a 400 X donde pueden observarse las células positivas para anexina V (A), células vivas y anexina V positiva visualizadas en campo claro (B) y células necróticas (IP positivas) (C).

### Ensayo cometa (Integridad del ADN)

Al finalizar la MIV, los ovocitos de cada tratamiento fueron separados de las CC por pipeteo repetido en medio HEPES-TCM-199. Las CC fueron lavadas tres veces en PBS libre de  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  con 1mg/ml PVP (Polivinilpirrolidona) y posteriormente disgregadas por aspiraciones con pipeta Pasteur de punta fina. Las muestras se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión y se realizó una electroforesis en gel de células individuales, utilizando la versión alcalina descrita por Singh y colaboradores (1988) y modificada por Tice y Strauss (1995). Para ello, los portaobjetos fueron cubiertos con una capa de 180  $\mu$ l de agarosa normal al 0,5 % (Carlsbad, Carlsbad, CA, USA), las CC se mezclaron con 75  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% (Carlsbad), se sembraron sobre los portaobjetos e inmediatamente se protegieron con cubreobjetos. Luego de la solidificación de la agarosa a 4 °C por 10 min., los cubreobjetos fueron removidos y los portaobjetos fueron sumergidos en solución de lisis durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, los portaobjetos fueron equilibrados en solución alcalina durante 20 min. La electroforesis se

realizó a 25 V y 300 mA (1,25 V/cm) por 30 min. Luego de la corrida electroforética, los portaobjetos fueron neutralizados mediante tres lavados de 5 min cada uno con buffer TRIS (pH 7,5) y luego con agua destilada. Las muestras fueron teñidas con una solución 1/1000 de SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) (Olive y col., 1999). El conteo se realizó a 400 X con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX40 equipado con un filtro de 515-560 nm) conectado a una cámara de video (Sony 3 CCD-IRIS). Basado en la presencia o no de ADN migrado en el gel (ADN fragmentado: “cola del cometa”), las células fueron clasificadas como células “Con o Sin Daño” respectivamente. Posteriormente, de acuerdo a la cantidad del ADN migrado, es decir, de acuerdo con la longitud de la cola del cometa las células se clasificaron en cinco categorías o grados: Grado 0 (cola no visible), Grado 1 (cometas con cola delgada), Grado 2 (cometas con cola difusa), Grado 3 (cometas con colas bien definidas), y grado 4 (cometas con una clara disminución en el diámetro de la cabeza y con una cola bien definida) (Figura 3.3). Las unidades de valor del daño del ADN fueron establecidas arbitrariamente de acuerdo a lo propuesto por Collins (2004). Se obtuvo el índice de daño genético (GDI) utilizando la siguiente fórmula:  $GDI = (1 \times I + 2 \times II + 3 \times III + 4 \times IV) / (0 + I + II + III + IV)$  (Pitarque y col., 1999).



**Figura 3.3** Clasificación de los Cometas según la longitud de sus colas. Grado 0 (cola no visible), Grado 1 (cometas con cola delgada), Grado 2 (cometas con cola difusa), Grado 3 (cometas con colas bien definidas) y Grado 4 (cometas con una clara disminución en el diámetro de la cabeza y con una cola bien definida), (Collins, 2004).

## Diseño experimental

### Efecto de ghrelina sobre la expansión y el número de células del *cumulus*

En el *Experimento 2*, los COC se maduraron durante 24 h individualmente como se describió anteriormente, y se midió la expansión del *cumulus*, antes y después de la MIV (descrito anteriormente). Para este propósito, 160 COC fueron madurados en cuatro repeticiones en días distintos. En cada repetición se procesaron 40 COC por tratamiento.

### Efecto de ghrelina sobre la maduración nuclear

En el *Experimento 3*, se evaluó la tasa de maduración nuclear de los ovocitos madurados en medio de MIV suplementado con 0, 20, 40, y 60 pM de ghrelina. Para este propósito, se maduraron aproximadamente 100 COC repartidos en 3 repeticiones en diferentes días. Luego de 24 h de MIV los ovocitos fueron despojados de las células del *cumulus* que lo rodean y se tiñeron con el colorante Hoechst 33342 para evaluar MII+CP (placa metafásica II + cuerpo polar).

### Efecto de ghrelina sobre la viabilidad

En el *Experimento 4*, los COC se maduraron en medio Control sin suplementar (0pM de ghrelina) y con el agregado de concentraciones crecientes de la hormona (20; 40 y 60 pM ghrelina) correspondientes a las concentraciones plasmáticas de un bovino en BEP, una concentración intermedia y la correspondiente a un BEN, respectivamente. Los ovocitos de cada tratamiento fueron separados de sus células del *cumulus* mediante pipeteo repetido en medio HEPES-TCM 199. La viabilidad de las CC y los ovocitos fue evaluada mediante la técnica de FDA como se describe en la sección de materiales y métodos. En

primera instancia se evaluaron las CC, donde se maduraron 480 COC repartidos en 3 repeticiones en diferentes días (160 COC por repetición, 40 COC/tratamiento). Se analizaron un total de 400 células por tratamiento bajo microscopio de fluorescencia a 400 X. Para el caso de la evaluación en los ovocitos se maduraron aproximadamente 100 COC por tratamiento tomándose solo la concentración máxima utilizada en este estudio (60 pM) contra el control (0 pM).

### Efecto de ghrelina sobre la tasa de apoptosis en células del *cumulus*.

En el *Experimento 5*, se evaluó el efecto del agregado de diferentes concentraciones de ghrelina (0; 20; 40 y 60 pM) al medio de MIV, sobre la apoptosis temprana de CC de COC madurados *in vitro*. La apoptosis fue evaluada como se describe en la sección de materiales y métodos. Para este propósito, se maduraron 600 COC repartidos en 3 repeticiones en diferentes días (200 COC por repetición, 50 COC/tratamiento). Se analizó un total de 200 células por tratamiento bajo microscopio de fluorescencia a 400 X.

### Efecto de ghrelina sobre la integridad del ADN de células del *cumulus*

En el *Experimento 6*, se evaluó el efecto de distintas concentraciones de ghrelina (0; 20; 40 y 60 pM) en el medio de MIV sobre el daño en el ADN de CC, evaluado por ensayo cometa. Los COC fueron madurados por 24 h y luego se evaluó el daño en el ADN como se describe previamente. Para este propósito se maduraron 240 COC en tres repeticiones (n= 3) de días diferentes (80 COC por repetición, 20 COC por tratamiento). Cada grupo de 20 COC fue procesado para analizar al menos 200 células por tratamiento.



## Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental en bloque completamente aleatorio. El análisis estadístico de las variables continuas (área de expansión del *cumulus*, número de CC, índice de daño genético) se realizó mediante una regresión lineal mixta con el procedimiento MIXED de SAS 9.0 (SAS Inst. Inc.). El modelo incluyó el efecto aleatorio del bloque (repeticiones  $n=4$  a  $6$ ) y el efecto fijo del tratamiento ( $0$  vs.  $20$  vs.  $40$  vs.  $60$  pM de ghrelina). En el caso del área de expansión se utilizó tiempo  $0$  ( $T_0$ ) como covariable. El análisis estadístico de las variables binomiales (tasa de apoptosis en CC y porcentaje de CC con daño en el ADN) se realizó mediante una regresión logística con el procedimiento GENMOD de SAS 9.0 (SAS Inst. Inc.). Se utilizó una distribución Binomial y un enlace Logit. El modelo logístico incluyó los efectos descriptos anteriormente (bloque y tratamiento). Cuando fue necesario rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias, se realizó una prueba de contrastes a posteriori (post hoc) mediante el Método de la Diferencia Mínima de Fisher. Las variables continuas se expresan como el promedio  $\pm$  EESM. Las variables binomiales (maduración nuclear, viabilidad, apoptosis y daño del ADN) están expresadas como porcentaje. Se consideraron efectos significativos a los valores de probabilidad ( $p$ )  $< 0,05$ , tendencias a las  $p < 0,10$  y  $p > 0,05$ .

## Resultados

### Efecto de ghrelina sobre el área de expansión del *cumulus*

En el *Experimento 2*, el área de expansión del *cumulus* (AEC) no presentó diferencias significativas entre los COC tratados con ghrelina ( $20$  pM;  $40$  pM y  $60$  pM) y

el Control. Por otro lado, con respecto al número de CC por COC tampoco hubo diferencias significativas entre el Control y las diferentes concentraciones de ghrelina (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1** Efecto de la ghrelina sobre la maduración in vitro de ovocitos bovinos.

Tiempo de MIV	Concentración de ghrelina	AEC ( $\mu\text{m}^2$ )	CC/COC (n)
<b>T0</b>		139271 $\pm$ 40748 <sup>a</sup>	3416,6 $\pm$ 1497,87 <sup>a</sup>
<b>T24</b>	<b>Control</b>	523541 $\pm$ 40748 <sup>b</sup>	9409,5 $\pm$ 1497,87 <sup>b</sup>
	<b>20 pM</b>	448626 $\pm$ 39196 <sup>b</sup>	8395,8 $\pm$ 1497,87 <sup>b</sup>
	<b>40 pM</b>	462383 $\pm$ 40748 <sup>b</sup>	9434,3 $\pm$ 1497,87 <sup>b</sup>
	<b>60 pM</b>	461749 $\pm$ 42443 <sup>b</sup>	11215 $\pm$ 1497,87 <sup>b</sup>

(<sup>a,b</sup>) Distintos superíndices dentro de una misma columna difieren a  $p \leq 0,05$ . Los datos correspondientes a AEC y CC/COC se expresan como el promedio  $\pm$  ESM. 160 COC fueron madurados en cuatro repeticiones en días distintos. En cada repetición se procesaron 40 COC por tratamiento. T0 (Tiempo 0: inmaduros) y T24 (24h de maduración).

### Efecto de ghrelina sobre la maduración nuclear

En el *Experimento 3*, se evaluó la maduración nuclear de los ovocitos luego de la MIV, mediante la observación MII + CP utilizando la tinción con Hoechts 33342. El porcentaje de MII + CP (porcentaje de maduración) se mantuvo en un rango de 90 - 95 % y no presentó diferencias significativas entre las distintas concentraciones de ghrelina empleadas y el Control (Tabla 3.2).

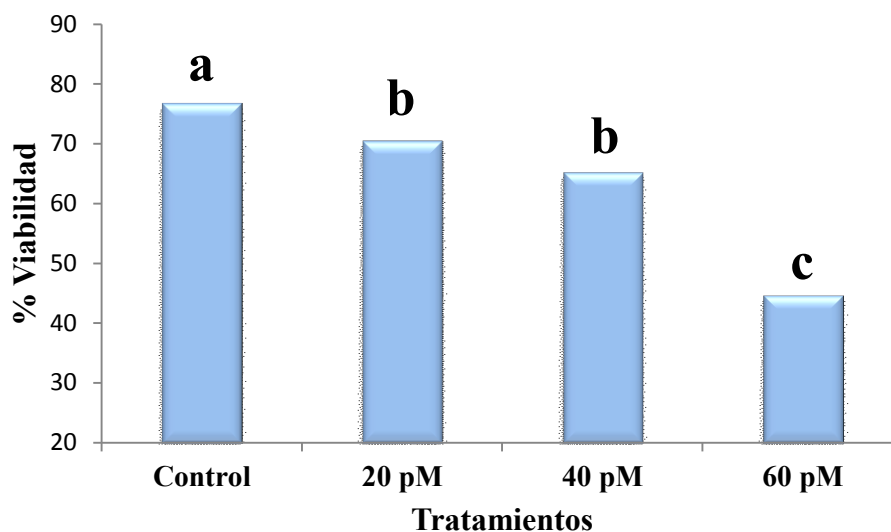
**Tabla 3.2** Efecto de la ghrelina sobre la maduración meiótica de ovocitos madurados *in vitro*.

Concentración de ghrelina	Nº Ovocitos	Porcentajes			
		MI	MII +CP	VG	Deg
<b>Control</b>	135	5,0	95,0	0,0	0,0
<b>20 pM</b>	125	8,2	90,7	0,0	1,1
<b>40 pM</b>	100	2,0	95,5	0,5	2,0
<b>60 pM</b>	94	6,4	91,3	0,0	2,3

Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin agregado de ghrelina (Control= 0 pM) y con ghrelina (20pM, 40pM, y 60pM). Los valores se expresan como porcentaje. Distintos superíndices dentro de la misma columna difieren a  $p < 0.05$ . MI (metafase I), M II + CP (metafase II y el primer corpúsculo polar), VG (vesícula germinal), Deg (ovocitos degenerados).

#### Efecto de ghrelina sobre la viabilidad de ovocitos y las células del *cumulus*

En el *Experimento 4*, se evaluó la viabilidad de los ovocitos y las CC de COC madurados con diferentes concentraciones de ghrelina. Si bien no se observaron diferencias significativas en la viabilidad de los ovocitos tratados con ghrelina [89,1% (90/101);  $p > 0,05$ ] con respecto al control [93,2% (96/103);  $p > 0,05$ ], la viabilidad de las CC disminuyó cuando los COC fueron madurados en presencia de ghrelina, presentando la menor cantidad de CC viables el tratamiento de 60pM ghrelina [76,75% (307/400); 70,5% (282/400); 65,25% (261/400) y 44,75% (179/400) de células vivas para el Control, 20, 40 y 60 pM respectivamente; ( $p < 0,05$ ; Figura 3.4).



**Figura 3.4** Efecto de la ghrelina sobre la viabilidad de las células del *cumulus* después de la MIV. Análisis de la viabilidad en CC evaluadas mediante la técnica combinada de azul de tripan (TB) - diacetato de fluoresceína (FDA). (<sup>a,b,c</sup>) Distintos superíndices  $p \leq 0,05$ .

#### Efecto de ghrelina sobre la tasa de apoptosis en células del *cumulus*

En el *Experimento 5*, se evaluó la tasa de apoptosis de las CC tratadas con diferentes concentraciones de ghrelina. La tasa de apoptosis fue mayor en las células cultivadas con el agregado de ghrelina respecto al Control ( $p < 0,05$ ). Las CC tratadas con 20, 40 y 60pM de ghrelina presentaron tasas de apoptosis similares ( $p > 0,05$ ; Tabla 3.3).

**Tabla 3.3** Análisis de la apoptosis en CC expuestas a diferentes concentraciones de ghrelina medidas por anexina V-FITC / PI.

Concentración de ghrelina	Nº CC	% CC		
		Vivas	Apoptóticas	Necróticas
<b>Control</b>	600	74,2 <sup>a</sup>	8,2 <sup>a</sup>	17,7 <sup>a</sup>
<b>20pM</b>	613	48,8 <sup>b</sup>	17,6 <sup>b</sup>	33,6 <sup>b</sup>
<b>40pM</b>	620	50,2 <sup>b</sup>	14,2 <sup>b</sup>	35,6 <sup>bc</sup>
<b>60pM</b>	601	47,1 <sup>b</sup>	14,2 <sup>b</sup>	38,7 <sup>c</sup>

(<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>) indican que los valores dentro de la misma columna difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ). Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin agregado de ghrelina (Control= 0 pM) y con ghrelina (20 pM, 40 pM, y 60 pM). Los valores se expresan como porcentaje de apoptosis (600 COC en 3 repeticiones, 200 COC por repetición, 50 COC por tratamiento en cada repetición). Se analizó un total de aproximadamente 200 células por tratamiento bajo microscopio de fluorescencia a 400 X.

### Efecto de ghrelina sobre la integridad del ADN de células del *cumulus*

En el *Experimento 6*, se evaluó la integridad del ADN de las CC de COC madurados en presencia de diferentes concentraciones de ghrelina durante la MIV (Tabla 3.4). El agregado de ghrelina durante la MIV aumentó el porcentaje de CC que presentaron daño en su ADN con respecto al grupo Control ( $p < 0,05$ ). Las concentraciones de 20 pM y 40 pM de ghrelina no presentaron diferencias significativas entre sí ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, la concentración de 60 pM produjo el mayor daño en el ADN de CC comparado con 20 pM y 40 pM ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.4** Análisis del daño en el ADN en células del *cumulus* expuestas a concentraciones crecientes de ghrelina evaluadas mediante ensayo cometa en su versión alcalina.

Concentración de ghrelina	Categorías de daño del ADN (%) <sup>*</sup>					Daño del ADN (%)	
	0	I	II	III	IV	(I+II+III+IV)	IDG <sup>**</sup>
<b>Control</b>	79,67 <sup>a</sup>	8,67 <sup>a</sup>	4,67 <sup>a</sup>	2,33 <sup>a</sup>	4,67 <sup>a</sup>	20,34 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>
<b>20 pM</b>	58,67 <sup>b</sup>	12,33 <sup>ab</sup>	10,33 <sup>bc</sup>	5,33 <sup>ab</sup>	13,33 <sup>b</sup>	41,32 <sup>b</sup>	1,02 <sup>b</sup>
<b>40 pM</b>	66,00 <sup>b</sup>	18,67 <sup>b</sup>	6,67 <sup>ab</sup>	3,00 <sup>a</sup>	5,67 <sup>a</sup>	34,01 <sup>b</sup>	0,63 <sup>a</sup>
<b>60 pM</b>	49,33 <sup>c</sup>	15,67 <sup>b</sup>	12,33 <sup>c</sup>	7,33 <sup>b</sup>	15,33 <sup>b</sup>	50,66 <sup>c</sup>	1,23 <sup>b</sup>

Se maduraron 240 COC en tres repeticiones en días diferentes (80 COC por repetición, 20 COC por tratamiento). Cada grupo de 20 COC fue procesado para analizar al menos 200 células por tratamiento. (<sup>a, b, c</sup>) indican que los valores dentro de la misma columna difieren significativamente ( $p \leq 0,05$ ).<sup>\*</sup> 0-IV indica los grados de daño en el ADN como valores medios  $\pm$  ESM de los datos agrupados de los tres experimentos independientes. <sup>\*\*</sup> Índice de daño genético (GDI) utilizando la siguiente fórmula:  $GDI = (1 \times I + 2 \times II + 3 \times III + 4 \times IV) / (0 + I + II + III + IV)$ .

## Discusión y conclusiones

El complejo ovocito-*cumulus* luego de la MIV sufre cambios morfológicos y funcionales como la formación de una matriz extracelular que se ubica entre las células del *cumulus* y produce la expansión del mismo. El componente principal de la matriz extracelular del *cumulus* expandido es el ácido hialurónico (Yudin y col., 1988; Salustri y col., 1989). La expansión del *cumulus* es un proceso esencial que facilita el

desprendimiento del COC de la pared del folículo, la extrusión durante la ovulación y la captura del COC por las fimbrias del oviducto (Meizel, 1985; Chen y col., 1993; Hess y col., 1999). Por otra parte, la expansión del *cumulus* puede influir en una gran variedad de cambios fundamentales para el desarrollo embrionario posterior (Vanderhyden y Armstrong 1989; Chen y col., 1993; Furnus y col., 1998). Este estudio demostró que el agregado de distintas concentraciones de ghrelina al medio de MIV (0, 20,40 y 60 pM) no altera el grado de expansión del *cumulus* luego de 24 h de maduración. Sin embargo, Dovolou y col, (2014a) también investigaron el efecto de ghrelina sobre la expansión del *cumulus* durante la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos evaluándolos en dos tiempos de maduración (18 h y 24 h). A diferencia de nuestro estudio, ellos observaron que la expansión del *cumulus* fue mayor en los COC tratados con ghrelina con respecto al control, tanto a las 18 h como a las 24 h de maduración. Cabe destacar que Dovolou y col. (2014a) definieron las concentraciones de ghrelina basados en el trabajo de Wertz-Lutz y col. (2006) en el que se evaluaron *in vivo* las concentraciones plasmáticas de ghrelina en vacas Simmental cruza con Angus. Sin embargo, existe gran variabilidad en los datos informados por diferentes grupos en lo referente a las concentraciones plasmáticas de ghrelina en bovino (Miura y col., 2004; Bradford y Allen, 2008). Estas variaciones están relacionadas con las razas, categorías, e incluso varían entre animales de la misma raza (Miura y col., 2004). En el presente trabajo de tesis las concentraciones de ghrelina se definieron de acuerdo con el trabajo de Miura y col, (2004). A diferencia de la mayoría de los trabajos donde se expresan las concentraciones en ng/ml o pg/ml, nos pareció más correcto expresarlo en pM. En este sentido, si comparamos las concentraciones utilizadas por Dovolou y col, (2014a) en su estudio (800 pg/ml) con respecto a las del presente

trabajo de tesis, vemos que corresponde a 237 pM, cuando en nuestro estudio se utilizaron 0, 20,40 y 60 pM de ghrelina.

Como ya mencionamos, la ghrelina presenta efectos diversos sobre la proliferación celular, ya que puede actuar inhibiendo (Ghe y col., 2002; Volante y col., 2003; Barreiro y col., 2004) o estimulándola (Kim y col., 2004, 2005; Tian y col., 2012; Li y col., 2014). Cuando evaluamos el efecto de ghrelina sobre el número de CC por COC, observamos que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, con respecto al control, es decir, la ghrelina al parecer no afectaría la proliferación de estas células. Sin embargo, la viabilidad en las CC mostró una marcada disminución en COC madurados en presencia de ghrelina de forma dosis dependiente. En el caso de los ovocitos, la viabilidad no presentó diferencias significativas en presencia de ghrelina con respecto al control. Si bien se ha observado que la ghrelina promueve la proliferación celular a través de mecanismos que inhiben la apoptosis (Rak-Mardyła y col., 2010a, 2010b; Liang y col., 2013), de forma controversial, también puede actuar como un factor proapoptótico dependiendo el tipo de célula (Bonfili y col., 2013). Estos hallazgos nos llevan a pensar que quizás la ghrelina afecte a las CC a través de mecanismos de apoptosis.

Las CC juegan un papel importante en la regulación de la maduración nuclear, participando en el mantenimiento del arresto meiótico y mediando el reinicio de la meiosis (Thomas y col., 2004), como también en la maduración citoplasmática del ovocito (Tanghe y col., 2002). Nuestros resultados mostraron que la tasa de apoptosis y el daño en el ADN en las CC presentaron un comportamiento similar. Se observó que la presencia de la concentración más alta de ghrelina (60pM) durante la MIV tuvo un efecto perjudicial sobre la integridad de las CC en el COC bovino, incrementando el daño en el ADN, la tasa de apoptosis y disminuyendo la viabilidad de las mismas. Las vías de señalización de ghrelina



que regulan la proliferación celular y la apoptosis involucran a los mediadores PI3-quinasa/Akt y MAPK /ERK1/2 (Waseem y col., 2014; Lee y col., 2016). Si bien se ha demostrado que la vía de señalización de MAPK está implicada en los procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia de las células eucariotas (Liang y col., 2007; Dupré y col., 2011), también se sabe que juega un papel importante en la maduración meiótica de los ovocitos de vertebrados (Nebreda y Ferby, 2000; Dupré y col., 2011). Dentro de la familia de las MAPKs se encuentran las quinasas reguladas por señal extracelular (ERK). Se describen dos isoformas de ERK (ERK 1 y 2), ampliamente expresadas en ovocitos de mamíferos (Ohashi y col., 2003; Popelkova y col., 2006). Existen evidencias que indican que ERK 1 y ERK 2, tras la disolución de la membrana nuclear (vesícula germinal), participa en la regulación de la organización de los microtúbulos, el montaje del huso meiótico y el mantenimiento de la actividad del factor promotor de la maduración (MPF, o también llamado factor promotor de la mitosis o factor promotor de la fase M) en los ovocitos bovinos (Gordon y col., 2001; Fan y Sun, 2004; Dupré y col., 2011). Un estudio puso de manifiesto que ghrelina regula la maduración *in vitro* de ovocitos ovinos a través de la actividad de la vía ERK1/2 (Bai y col., 2012). Por otra parte, Popelkova y col. (2006) demostraron que la ghrelina añadida al medio de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos causó un aumento significativo en la expresión de ERK1 y ERK2. El papel fisiológico preciso de las MAPKs (ERK1/2) en la maduración del ovocito sigue sin comprenderse del todo, aunque existen evidencias que la finalización de la meiosis en los ovocitos va acompañada de una disminución en la expresión de estas moléculas (Popelkova y col., 2006). Si bien este fenómeno no sucede de forma general en todos los tipos celulares, el incremento en los niveles (tanto citosólicos como nucleares) de

las quinasas ERK1/2 activas, resulta en efectos mitogénicos y antiapoptóticos, mientras que la disminución de la actividad desencadena efectos opuestos (DeFea y col., 2000).

Algunos trabajos realizados *in vitro*, evaluaron los efectos de la suplementación con ghrelina sobre la maduración de los ovocitos en diferentes especies. El grupo de Suzuki y col., (2010) demostró que altas concentración de ghrelina (148 nM) afectaban negativamente a la estabilización de los microtúbulos y microfilamentos citoplasmáticos, alterando la correcta maduración (progresión meiótica y la distribución del citoesqueleto) de los ovocitos porcinos. En el citado estudio se observó un efecto tanto en ovocitos con *cumulus* intacto como en ovocitos desnudos, lo que lleva a pensar que la ghrelina podría estar afectando la organización del citoesqueleto del ovocito por una vía que no involucra a las CC. Es importante destacar que las concentraciones de ghrelina utilizadas en ese caso fueron muy superiores a las reportadas *in vivo* en la especie porcina (80 pM) (Scrimgeour y col., 2008). Por otra parte, Dashtizad y col., (2011) investigaron el efecto de la ghrelina sobre la maduración nuclear de ovocitos bovinos madurados *in vitro*. En este trabajo la suplementación con bajas concentraciones (1 nM y 15 nM) de ghrelina mostró un aumento en la tasa de ovocitos que alcanzaron la metafase II. Sin embargo, una mayor concentración de ghrelina (297 nM) redujo significativamente la tasa de maduración nuclear de los ovocitos. Es interesante destacar que incluso las dosis más bajas utilizada en este estudio están muy por encima de las concentraciones plasmáticas reportadas *in vivo* (Miura y col., 2004; Wertz-Lutz y col., 2006; Bradford y Allen, 2008). En otro estudio, Dovolou y col. (2014a) también investigaron el efecto de ghrelina sobre la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos evaluados en dos tiempos de maduración (18 h y 24 h). Observaron una mayor cantidad de ovocitos que alcanzaron MII a las 18 h madurados con ghrelina (237pM) en comparación al control, mientras que no se observaron diferencia

cuando la maduración duró 24 h. En el presente trabajo de tesis se ha evaluado la maduración nuclear de los ovocitos luego de la MIV, y se observó que el porcentaje de maduración nuclear se mantuvo en un rango de 90-95 % y no hubo diferencias significativas entre los ovocitos tratados con ghrelina y el control. Se han demostrado los efectos de ghrelina sobre la maduración de los ovocitos bovinos, pero la forma en la que esta hormona actúa sobre las CC y los ovocitos suponen mecanismos más complejos a investigar. Sin bien no hemos estudiado la expresión de las MAPKs en relación a la concentración de ghrelina en el medio, hay trabajos que sugieren que esta hormona podría estar regulando la maduración de los ovocitos bovinos a través de esta vía (Popelkova y col., 2006; Dupré y col., 2011).

En conclusión, los resultados de este capítulo indicaron que: 1) el agregado de ghrelina al medio de MIV no modificó la expansión del *cumulus* y el número de CC de ovocitos bovinos; 2) la maduración nuclear de los ovocitos tampoco se vio afectada por el agregado de ghrelina; 3) la viabilidad de los ovocitos no se vio afectada por el agregado de ghrelina, pero sí disminuyó la viabilidad de las CC conforme aumentaron las concentraciones de la hormona ; 4) la tasa de apoptosis en las CC aumentó con el agregado de ghrelina; 5) y el porcentaje de CC con daño en el ADN aumentó conforme aumentaron las concentraciones de la hormona.

## **Capítulo 4**

**EFFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE GHRELINA  
SOBRE LA CAPACIDAD DE DESARROLLO DE LOS OVOCITOS  
HASTA EL ESTADÍO PREIMPLANTACIONAL DE BLASTOCISTO**

## Introducción

Luego de la fecundación, la membrana nuclear del espermatozoide se rompe y se forma una nueva membrana nuclear dando lugar al pronúcleo masculino (PNM). Al mismo tiempo el ovocito finaliza la meiosis II, se libera el segundo corpúsculo polar, el genoma materno también se descondensa, se forma la membrana nuclear y queda constituido el pronúcleo femenino (PNF) (Martínez Madrid, 2002; Sun y Nagai, 2003). Luego de la formación de los PNM y PNF estos migran gradualmente hacia el centro del ovocito donde se aproximan el uno con el otro. Durante este trayecto replican su ADN, se desintegran sus membranas nucleares y sus cromosomas se asocian preparándose para la primera división mitótica (Martínez Madrid, 2002; Elder y Dale, 2011). La fusión de los pronúcleos masculino y femenino se considera el fin del proceso de fecundación y el inicio del desarrollo embrionario.

La eclosión del embrión es un proceso fundamental y un requisito previo para la implantación (Cohen, 1991). Este proceso implica el escape del blastocisto a través de la zona pelúcida, debido al adelgazamiento y la ruptura de la zona pelúcida mediada por enzimas embrionarias y/o uterinas, junto con la expansión y colapso repetidos del blastocisto (Cohen, 1991). En algunos estudios han observado una relación entre la capacidad de eclosión (hatched) y las células del macizo celular interno (MCI) y el trofoectodermo (TE) de los embriones (Gonzales y col., 1996; Van Soom y col., 1997; Xinling y col., 2013).

Se sabe que la maduración del ovocito es un fenómeno sumamente crítico del cual depende la capacidad de desarrollo embrionario posterior (Krisher, 2004; Watson, 2007). Sólo los ovocitos que han madurado correctamente (maduración nuclear y citoplasmática) pueden ser fecundados, desarrollar normalmente hasta el estadio preimplantacional de

blastocisto y dar origen a fetos viables (Moor y Trounson, 1977; Schroeder y Eppig, 1984; Gil Corbalán, 2001). Así, la maduración es el resultado de una compleja interacción entre el ovocito, las células del *cumulus* y el medio ambiente que lo rodea (Moor y col., 1998). En condiciones *in vitro*, el medio de MIV representa el entorno del ovocito y de su composición depende en gran medida, su capacidad de desarrollo posterior (Abeydeera, 2002).

Se sabe que las CC se hallan unidas metabólicamente al oolema de la célula germinal a través de uniones *gap* (Anderson y Albertini, 1976; Heikinheimo y Gibbons, 1998). Estas uniones *gap* permiten la comunicación bilateral entre las CC y el ovocito, permitiendo el correcto funcionamiento de ambos tipos celulares. Como consecuencia de esta dependencia mutua, cualquier proceso de apoptosis que sufran las CC impacta de manera directa en la propia célula germinal, es decir, un alto grado de apoptosis en las CC produce una disminución en la calidad del ovocito y en su capacidad para desarrollar hasta el estadio de blastocisto (Høst y col., 2002; Ikeda y col., 2003; Corn y col., 2005). La alteración de la célula germinal, producto de un elevado número de CC con apoptosis, se ha visto reflejada en menores tasas de fertilización (Høst y col., 2002) y de blastocistos (Corn y col., 2005). Esto podría deberse a la particular comunicación que existe entre las CC y el ovocito (Corn y col., 2005). Seino y colaboradores (2002) demostraron que el aumento del daño en la molécula de ADN de las CC, durante la maduración del ovocito, reduce la tasa de fertilización y la calidad de los blastocistos obtenidos (blastómeros asimétricos y con mayor fragmentación).

Se ha observado en diferentes especies, que las altas concentraciones de ghrelina adicionadas al medio de MIV durante la maduración *in vitro* pueden alterar algunos de estos eventos (Suzuki y col., 2010; Dashtizad y col., 2011; Dovolou y col, 2014a; Capítulo

3 de la presente tesis). Hasta el momento, son escasos los trabajos que investigan los efectos de ghrelina sobre la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario posterior, en comparación con los relacionados a los mecanismos de acción de la hormona, su expresión en los diferentes tejidos, los efectos sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y la secreción de gonadotrofinas (Fernandez-Fernandez y col., 2006; Tena-Sempere, 2008; Lorenzi y col., 2009; Dupont y col., 2010; Rak-Mardyla y col., 2012; Deaver y col., 2013). A su vez, se observan resultados contradictorios en aquellos trabajos que han evaluado los efectos de ghrelina, adicionada al medio de MIV y/o CIV, sobre el desarrollo embrionario posterior. Algunos trabajos reportan un efecto positivo de ghrelina sobre el desarrollo embrionario (Zhang y col., 2007; Wang y col., 2013), otros no encontraron efecto sobre los parámetros evaluados (Dashtizad y col., 2011), mientras que algunos trabajos ponen de manifiesto el efecto negativo de la hormona (Kawamura y col., 2003; Dovolou y col., 2014a). Esto puede deberse en principio al momento de la suplementación con la hormona (en la MIV o en la CIV), las concentraciones de ghrelina utilizadas en cada ensayo, como así también la especie sobre la cual se trabajó.

La hipótesis que se pretende demostrar es el efecto negativo de ghrelina sobre el desarrollo embrionario bovino hasta el estadio preimplantacional de blastocisto. En consecuencia, se diseñaron una serie de experimentos con el fin de estudiar el efecto del agregado de ghrelina, en diferentes concentraciones durante la MIV, sobre: 1) el desarrollo embrionario posterior hasta el estadio preimplantacional de blastocisto y 2) la calidad de los embriones evaluada en términos de velocidad de desarrollo, porcentaje de embriones eclosionados (hatched) y número de células por blastocisto a día 8 de cultivo.

## Material y métodos

### Complejos Ovocito-*Cumulus* (COC)

La obtención de los ovocitos se llevó a cabo como se describió previamente (Capítulo 3). Las repeticiones de cada experimento (n= 7) se realizaron en diferentes días y en cada día se obtuvieron aproximadamente 160 COC, utilizando 40 COC por tratamiento.

### Maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos

Los medios y procedimientos utilizados para la MIV corresponden a los descritos previamente en la sección materiales y métodos (ver Capítulo 3). El medio de MIV fue suplementado con ghrelina de modo de alcanzar las siguientes concentraciones: 20 pM, 40 pM y 60 pM. También se trabajó con un tratamiento Control sin suplementar (0 pM de ghrelina) (ver Capítulo 2).

### Fecundación *in vitro* (FIV)

#### a) Preparación de las cajas de FIV

Luego de preparar el medio de FIV (ver apéndice 1), se armaron las placas de Petri con gotas de 30  $\mu$ l de medio y se cubrieron con aceite mineral. Las cajas fueron incubadas para equilibrar el pH del medio (7,2-7,4) a 39° C en atmósfera gaseada con 5% CO<sub>2</sub> en aire y humedad a saturación durante un tiempo mínimo de 2 h.

#### b) Preparación de los ovocitos para la FIV.

Después de 24 h de MIV se lavaron los COC rápidamente en HEPES-TALP sin quitarles las células del *cumulus*. Luego se lavaron 2 veces en medio FIV, se tomaron 10



COC en un volumen de 10  $\mu$ l de medio y se sembraron en cada gota de FIV preparada previamente. Los COC se mantuvieron en estufa a 39°C hasta el momento de la inseminación.

#### c) Procesamiento del semen

Con el objetivo de separar los espermatozoides vivos se utilizó un gradiente de Percoll. En un tubo cónico de 15 ml se colocaron 2 ml de Percoll 90% y se agregaron cuidadosamente sobre él 2ml de Percoll 45%. Tanto el Percoll 90% como el 45% se encontraban a temperatura ambiente al momento de su utilización. Luego, se descongelaron 2 pajuelas de semen, se evaluó la calidad del mismo y se sembró sobre la superficie del gradiente de Percoll. El gradiente se centrifugó a 700 g durante 15-30 minutos y se retiró cuidadosamente el pellet (espermatozoides vivos) con una pipeta Pasteur para transferirlo a otro tubo. Se agregó 250  $\mu$ l de HEPES-TALP, se homogeneizó agitando suavemente y se volvió a centrifugar a 200 g durante 5 min. Luego de descartar el sobrenadante el pellet se resuspendió en 200  $\mu$ l de medio de FIV y se mantuvo en la incubadora. Se tomó una muestra para determinar la concentración de espermatozoides utilizando una cámara de Neubauer y microscopio óptico. Finalmente se ajustó el volumen con medio de FIV para obtener una suspensión de 10 millones de espermatozoides/ml.

#### d) Fertilización

Se agregó rápidamente 10  $\mu$ l de la suspensión de espermatozoides concentrada (10 millones/ml) a las gotas de FIV que ya contenían los ovocitos. Se incubó durante 24 h a 39°C en atmósfera gaseada con 5% CO<sub>2</sub> en aire con humedad a saturación. La concentración final de espermatozoides en la gota de FIV fue de 2 millones/ml.

## Cultivo *in vitro* (CIV) de embriones

Se prepararon gotas de 30  $\mu$ l con medio SOFm (ver anexo) en cajas de Petri bajo aceite mineral. Las cajas de CIV se prepararon 2 h antes de la siembra y se incubaron a 39° C en atmósfera gaseada con una mezcla de 7% O<sub>2</sub>- 5% CO<sub>2</sub>- 88% N<sub>2</sub> y humedad a saturación. Luego de 24 h de FIV, los presuntos cigotos se separaron de las CC con pipeta y se lavaron 2 veces en HEPES-SOF y 2 veces en SOFm. Los presuntos cigotos se tomaron en un volumen de 10  $\mu$ l y se sembraron en las gotas de 30  $\mu$ l de SOFm previamente equilibradas, alcanzando un volumen final de 40  $\mu$ l de medio en las gotas de CIV. Los embriones se cultivaron en medio SOFm sin glucosa durante las primeras 24 h de cultivo (D1) y SOFm con 1,5 mM de glucosa desde el día 2 (D2) hasta el día 8 (D8). El medio de cultivo se renovó cada 48 h.

## Número de células por blastocisto al día 8

El recuento de las células de la masa celular interna (MCI) y del trofoectodermo (TE) de los blastocistos se realizó mediante la técnica de tinción diferencial. Los fluorocromos utilizados fueron Ioduro de propidio (IP) (Sigma P- 4170) que tiñe el ADN de las células del TE en rojo, y la Bisbenzimida (Bb) (Hoecht 33342) (Sigma B-2261) que tiñe el ADN de las células de la MCI en azul. Se preparó una placa de 4 pocillos. El primer pocillo contenía una solución 800  $\mu$ l de PBS; el segundo pocillo contenía 800  $\mu$ l de IP 0,1 mg/ml en PBS+0,2% tritón (X-100); el tercer pocillo contenía 800  $\mu$ l de Bb 25 mg/ml en etanol a 99,5%; y por último el cuarto pocillo contenía 800  $\mu$ l de glicerol para facilitar el montaje de los embriones en el portaobjetos. Los embriones fueron lavados 3 veces en PBS. Luego se transfirieron en grupos de 4-5 embriones al segundo pocillo donde se incubaron durante 1 min. A continuación, se transfirieron al tercer pocillo donde se incubaron durante 3 min.

Para finalmente transferir los embriones al cuarto pocillo, desde el cual se montaron en portaobjetos. El recuento de las células de los blastocistos (a día 8, Grado 1) se determinó con un microscopio de epifluorescencia a 40 X y con filtro de excitación de 365 nm, filtro de barrido de 400 nm y un filtro de emisión de 400 nm. El recuento celular se llevó a cabo a partir de las imágenes de los embriones, capturadas a través una cámara (SONY-CCD) acoplada al microscopio empleando un software de análisis de imágenes microscópicas (Image ProPlus® 3.1).

## **Diseño experimental**

### **Efecto de la ghrelina sobre la tasa de formación de pronúcleos**

En el *Experimento 7* se evaluó la tasa de formación de pronúcleos después de la coincubación de los gametos durante 18 h de FIV. Los ovocitos, presuntamente fertilizados, fueron liberados de las CC mediante pipeteo repetitivo con pipeta de punta fina. Luego se incubaron en una solución de 10 mg/L del fluorocromo Hoechst 33342 durante 15 min a temperatura ambiente, y finalmente los presuntos cigotos se montaron entre porta y cubreobjeto. Los preparados se observaron con microscopio de epifluorescencia utilizando un filtro de 410 nm a 250x y 400x de aumentos. Los ovocitos fueron considerados como fertilizados cuando se identificaron ambos pronúcleos.

### **Efecto de la ghrelina sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos hasta el estadio preimplantacional de blastocisto**

En el *Experimento 8* se evaluó el efecto de distintas concentraciones de ghrelina (Control= 0 pM; 20 pM; 40 pM y 60 pM) en el medio de MIV sobre la capacidad de

desarrollo posterior hasta el estadio de preimplantacional de blastocisto. Para este propósito, se maduraron *in vitro* un total de 1553 COCs con distintas concentraciones de ghrelina obtenidos en 6 días diferentes. La tasa de clivaje se evaluó a las 48 horas luego de la inseminación. La tasa de blastocistos incluyó aquellos embriones que progresaron hasta el estadio de blastocisto expandido al día 8.

### Efecto de la ghrelina sobre la velocidad de desarrollo de los ovocitos hasta el estadio preimplantacional de blastocisto

En el *Experimento 9* se evaluó la velocidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto de los ovocitos madurados en medio de MIV con el agregado de distintas concentraciones de ghrelina (Control= 0 pM; 20 pM; 40 pM y 60 pM). Para ello, se evalúa el número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto los días 6, 7 y 8 de cultivo. Los datos fueron obtenidos a partir de los embriones cultivados en el *Experimento 8*.

### Efecto de la ghrelina sobre el número de células por blastocisto a día 8

En el *Experimento 10* se analizó el efecto de distintas concentraciones de ghrelina (Control= 0 pM; 20 pM; 40 pM y 60 pM) sobre el número promedio de células por blastocisto al día 8 de cultivo y la tinción diferencial de las células del MCI y el TE. El número de células se evaluó sobre un total de 49 blastocistos en 3 repeticiones independientes.

### Efecto de la ghrelina sobre la capacidad de eclosión de los blastocistos

En el *Experimento 11* se evaluó el efecto de distintas concentraciones de ghrelina (Control= 0 pM; 20 pM; 40 pM y 60 pM) en el medio de MIV sobre la capacidad de los

embriones de progresaron hasta el estadio de blastocisto eclosionado. El porcentaje de eclosión (*hatching*) se evaluó al día 9.

### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental en bloque completamente aleatorio. El análisis estadístico de las variables binomiales (tasa de clivaje, tasa de blastocisto y tasa de *hatching*) se realizó mediante una regresión logística con el procedimiento GENMOD de SAS 9.0 (SAS Inst. Inc.). Se utilizó una distribución Binomial y un enlace Logit. El modelo logístico incluyó los efectos del bloque ( $n=6$ ) y del tratamiento (0 vs. 20 vs. 40 vs. 60 pM de ghrelina). El conteo de células por blastocisto se analizó con el procedimiento GENMOD de SAS 9.0 (SAS Inst. Inc.). Las variables continuas se expresan como el promedio  $\pm$  EEM. Las variables binomiales están expresadas como porcentaje. Se consideraron efectos significativos a los valores de probabilidad  $p < 0,05$  y tendencias a los valores de  $p$  entre  $< 0,10$  y  $> 0,05$ . Los resultados de las tasas se expresan como porcentaje (%), mientras que el número de células por embrión corresponden al promedio  $\pm$  EEM.

## Resultados

### Efecto de la ghrelina sobre la tasa de formación de pronúcleos

En el *Experimento 7*, la tasa de formación de pronúcleos disminuyó cuando los ovocitos se maduraron con el agregado de ghrelina al medio de MIV (20; 40 y 60 pM) con respecto al control (0 pM) ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.1).

**Tabla 4.1** Efecto de ghrelina sobre el porcentaje de formación de pronúcleos en ovocitos madurados *in vitro*.

Concentración de ghrelina	Nº ovocitos	No fecundados	1 PN (%)	2 PN (%)	>2 PN (%)
<b>Control</b>	115	12 <sup>a</sup> (10,4)	33 <sup>a</sup> (28.6)	69 <sup>a</sup> (60.0)	1 <sup>a</sup> (0.8)
<b>20 pM</b>	116	9 <sup>a</sup> (7,7)	59 <sup>b</sup> (50.8)	48 <sup>b</sup> (41.3)	0 <sup>a</sup> (0)
<b>40 pM</b>	122	12 <sup>a</sup> (9,8)	64 <sup>b</sup> (52.4)	45 <sup>b</sup> (36.8)	1 <sup>a</sup> (0.8)
<b>60 pM</b>	119	10 <sup>a</sup> (8,4)	61 <sup>b</sup> (57.9)	46 <sup>b</sup> (38.6)	2 <sup>a</sup> (1.6)

(<sup>a,b</sup>) Distintos superíndices dentro de la misma columna  $p \leq 0,05$ . La tasa de pronúcleo se evaluó 18 h después de la inseminación (472 COC madurado y fertilizado en tres repeticiones). Los presuntos cigotos se incubaron en Hoechst 33342 y luego se examinaron bajo microscopio fluorescente (200x y 400x). **PN** (pronúcleos); **1PN**: un pronúcleo; **2PN**: dos pronúcleos; **>2PN**: polispermia.

### Efecto de la ghrelina sobre la capacidad de desarrollo de los ovocitos hasta el estadio preimplantacional de blastocisto

En el *Experimento 8*, la tasa de clivaje evaluada a las 48 h post inseminación y teniendo en cuenta el porcentaje de embriones de 2 células, fue similar en todos los grupos estudiados. No hubo diferencias significativas en la tasa de clivaje cuando se agregó ghrelina al medio de MIV en ninguna de las concentraciones estudiadas (20, 40, y 60 pM), con respecto al control (0pM) ( $p > 0,1$ ; Tabla 4.2). Sin embargo, los porcentajes de blastocistos fueron significativamente menores para los ovocitos madurados con 40 pM y 60 pM de ghrelina respecto al Control y 20 pM ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.2). Las diferencias en la

tasa de blastocistos, entre el grupo Control y 20 pM no fueron significativas ( $p > 0,05$ ; Tabla 4.2).

**Tabla 4.2** Capacidad de desarrollo de ovocitos bovinos madurados *in vitro* con diferentes concentraciones de ghrelina.

Concentración de ghrelina	Nº Ovocitos	% de Clivados	% Blastocistos/CIV
<b>Control</b>	397	75,7 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>
<b>20 pM</b>	376	78,4 <sup>a</sup>	28,6 <sup>ab</sup>
<b>40 pM</b>	385	72,6 <sup>a</sup>	24,8 <sup>b</sup>
<b>60 pM</b>	395	70,9 <sup>a</sup>	23,3 <sup>b</sup>

Los valores con distintos superíndices dentro de cada fila difieren en  $p < 0,05$ . Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin suplementar (Control= 0 pM ghrelina) o suplementados con ghrelina (20, 40 y 60 pM). Los valores se expresan como porcentaje. La tasa de clivaje se evaluó a las 48 h luego de la inseminación. La tasa de blastocistos incluye aquellos embriones que alcanzaron este estadio luego de 8 días de cultivo. Se utilizaron 1553 COC en 6 repeticiones en diferente días.

Efecto de la ghrelina sobre la velocidad de desarrollo de los ovocitos hasta el estadio preimplantacional de blastocisto

En el *Experimento 9*, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de embriones obtenidos al día 6, 7 y 8 de cultivo entre los ovocitos madurados con ghrelina (20; 40 y 60 pM) y el control (0 pM ghrelina) ( $p > 0,05$ ; Tabla 4.3).

**Tabla 4.3** Efecto de la presencia de diferentes concentraciones de ghrelina sobre la velocidad de desarrollo de ovocitos bovinos madurados *in vitro*.

Concentración de ghrelina	Nº Blastocistos	Blastocistos día 6 %	Blastocistos día 7 %	Blastocistos día 8 %
<b>Control</b>	116	33,6	37,1	29,3
<b>20 pM</b>	94	33,0	41,5	25,5
<b>40 pM</b>	86	30,2	32,6	37,2
<b>60 pM</b>	81	28,2	40,0	31,8

Los valores se expresan como el porcentaje de blastocistos alcanzado al día 6, día 7 y día 8 de cultivo para cada tratamiento. Los valores corresponden a 337 blastocistos en 7 repeticiones.

#### Efecto de la ghrelina sobre el número de células por blastocisto al día 8

En el *Experimento 10*, el número total de células por blastocisto disminuyó significativamente conforme aumentaron las concentraciones de ghrelina (20, 40 y 60 pM) respecto al control ( $p < 0,05$ ). La relación MCI /número total de células fue significativamente menor con el agregado de ghrelina (20, 40 y 60 pM) en comparación con el control ( $p < 0,05$ ; Tabla 4.4).



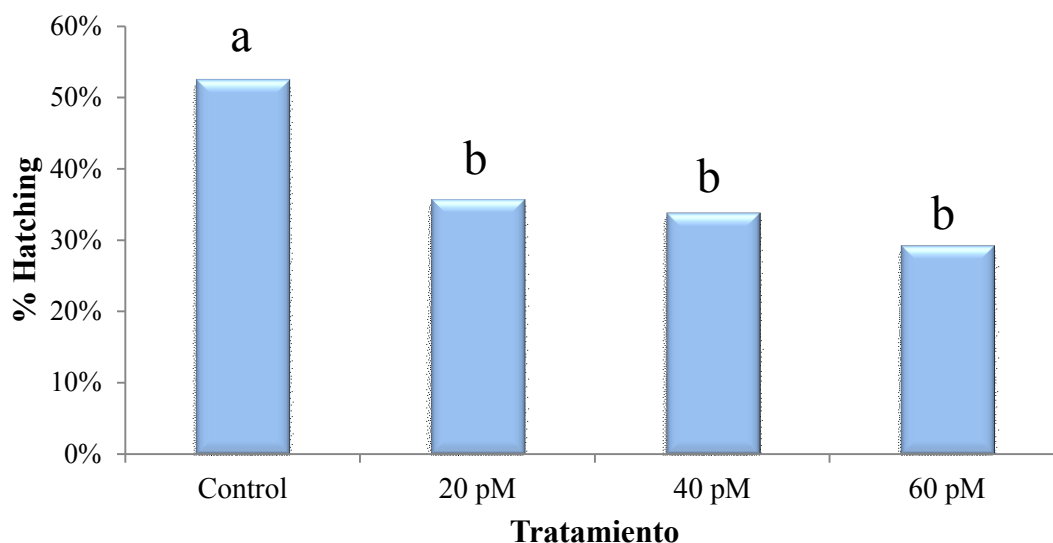
**Tabla 4.4** Efecto de la presencia de diferentes concentraciones de ghrelina durante la maduración *in vitro* sobre el número de células por blastocisto.

Concentración de ghrelina	Nº Blastocistos	MCI	TE	Total	MCI/total
<b>Control</b>	11	31,0 ± 0,95 <sup>a</sup>	86,1 ± 3,02 <sup>a</sup>	117,1 ± 3,27 <sup>a</sup>	26,5 ± 0,94 <sup>a</sup>
<b>20 pM</b>	12	24,1 ± 0,91 <sup>b</sup>	81,7 ± 2,89 <sup>ab</sup>	105,1 ± 3,13 <sup>b</sup>	22,8 ± 0,90 <sup>b</sup>
<b>40 pM</b>	13	19,6 ± 0,87 <sup>c</sup>	75,8 ± 2,78 <sup>b</sup>	95,5 ± 3,01 <sup>c</sup>	20,7 ± 0,86 <sup>bc</sup>
<b>60 pM</b>	13	14,8 ± 0,87 <sup>d</sup>	67,2 ± 2,78 <sup>b</sup>	82,1 ± 3,01 <sup>d</sup>	18,3 ± 0,86 <sup>c</sup>

(a,b,c,d) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Macizo celular interno (MCI) y trofoectodermo (TE). Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin suplementar (Control= 0 pM ghrelina) y suplementados con ghrelina (20, 40 y 60 pM). Los valores se expresan como el promedio del número de células/blastocisto ± EEM. Se evaluaron un total de 49 blastocistos en 4 repeticiones.

### Efecto de la ghrelina sobre la capacidad de eclosión de los blastocistos

En el *Experimento 11*, la tasa de *hatching* fue significativamente menor en los grupos suplementados con ghrelina con respecto al Control (Control= 40,8 %; 20 pM = 31 %; 40 pM = 27,3 %; 60 pM = 25,5 %) ( $p < 0,05$ ; Figura 4.1).



**Figura 4.1** Efecto de diferentes concentraciones de ghrelina en el medio de MIV sobre el porcentaje de blastocistos eclosionados (*hatched*) a día 9. Distintos superíndices <sup>(a, b)</sup> indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Los COC bovinos se incubaron en medio de MIV sin suplementar (Control= 0 pM ghrelina) o suplementados con de ghrelina (20; 40 y 60 pM). Los valores se expresan como el porcentaje de blastocistos eclosionados/blastocistos totales por tratamiento (Control= 40,8 %; 20 pM = 31 %; 40 pM = 27,3 %; 60 pM = 25,5 %). Se evaluaron un total de 262 blastocistos en 6 repeticiones.

## Discusión y conclusiones

Las primeras etapas del desarrollo embrionario son dependientes, en gran medida, de los sucesos que ocurren durante la maduración del ovocito (Krisher, 2004). Algunos trabajos han estudiado el efecto de ghrelina sobre la maduración *in vitro* de ovocitos y su capacidad de desarrollo embrionario posterior, adicionando al medio de MIV diferentes concentraciones de la hormona. Estos estudios, realizados en diferentes especies, reportaron datos contradictorios con respecto al efecto de la ghrelina sobre el desarrollo

embrionario (Zhang y col., 2007; Dashtizad y col., 2011; Wang y col., 2013; Dovolou y col., 2014a). Por un lado, algunos trabajos observaron que la ghrelina promueve la formación de blastocistos (Zhang y col., 2007; Wang y col., 2013), mientras que otros trabajos reportaron que la formación de blastocistos se ve afectada, positiva o negativamente, de acuerdo a la concentración de ghrelina adicionada al medio de MIV (Dashtizad y col., 2011), o que las altas concentraciones de esta hormona reducen significativamente el desarrollo embrionario (Dovolou y col., 2014a). En el presente trabajo, como forma de valorar una correcta fertilización, evaluamos la tasa de formación de pronúcleos y observamos que esa tasa disminuyó cuando los ovocitos se maduraron con el agregado de ghrelina al medio de MIV (20, 40 y 60 pM) con respecto al control (0 pM).

Por otra parte, cuando evaluamos la tasa de clivaje (relevamiento de embriones de 2 células), en ovocitos madurados *in vitro* con el agregado de ghrelina (20, 40 y 60 pM), no encontramos diferencias con respecto al control (0 pM ghrelina), lo que sugiere que la ghrelina pueda retrasar, mediante alguna de sus vías de acción, la formación de los pronúcleos (evaluados a las 18 h posteriores a la FIV) y al evaluar la tasa de clivaje (a las 48 h posteriores a la FIV) no hayamos encontrado diferencias. Se sabe que antes de la fecundación los ovocitos de mamífero son detenidos en la MII de la división celular (Whitaker 1996), y en los vertebrados la vía Mos/MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos) sirve para estabilizar al factor de promoción de la maduración (MPF), asegurando el arresto meiótico (Dupré y col., 2011). Por otra parte, algunos trabajos demostraron que la ghrelina actúa a través de la vía de MAPK regulando la maduración *in vitro* de los ovocitos (Popelkova y col., 2006; Bai y col., 2012). A su vez, esta hormona mediante su receptor GHS-R1a, activa la vía de señalización del fosfolípido inositol/fosfolipasa C que culmina con el aumento en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{+2}$ ,

la misma vía que activa el espermatozoide fertilizante para reanudar la meiosis y el desarrollo del ovocito (Machaty, 2016). En este punto, ghrelina podría estar afectando el proceso de maduración y fertilización a través de estas vías, lo que se vería reflejado en una menor tasa de formación de pronúcleo.

Dovolou y col. (2014a), en un estudio llevado a cabo en ovocitos bovinos madurados *in vitro* con diferentes concentraciones de ghrelina, no encontraron diferencias en la tasa de clivaje. En contraste, Dashtizad y col. (2011) reportaron un ligero aumento en la tasa de clivaje cuando los COCs bovinos se maduraron con 15 nM de ghrelina, mientras que la tasa de clivaje disminuyó marcadamente en el grupo madurado con 297 nM de ghrelina. Si bien el grupo de Dovolou y colaboradores (2014a), como se mencionó previamente, tomó las concentraciones de ghrelina (60, 237 y 593 pM) de un estudio realizado por *in vivo* por Wertz-Lutz y colaboradores (2006). Las concentraciones utilizadas en el trabajo de Dashtizad y col. (2011) (1, 15,148 y 297 nM) están muy por encima de los valores plasmáticos registrados en animales *in vivo*.

En el presente estudio, cuando evaluamos el efecto del agregado de ghrelina en concentraciones crecientes durante la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos bovinos, observamos que la producción de embriones que desarrollaron hasta el estadio de blastocisto disminuyó cuando los ovocitos se maduraron con 20, 40y 60 pM de la hormona, siendo significativamente más baja la tasa de blastocistos obtenida con 60 pM con respecto al control (0 pM). Estos hallazgos concuerdan con los reportados por Dovolou y col. (2014b) en los que observaron que la ghrelina redujo significativamente la tasa de formación de embriones bovinos en todas las concentraciones (60, 237 y 593 pM) agregadas al medio de MIV. Este mismo grupo, en un estudio previo (Dovoluo y col., 2014a), investigando el efecto de ghrelina sobre desarrollo *in vitro* de embriones bovinos y

la calidad embrionaria (en términos de expresión de ciertos genes relacionados con la implantación, el metabolismo, el estrés oxidativo y la apoptosis) observaron que la hormona afectaba los niveles de expresión de estos genes.

En ovinos, se evaluó el efecto sobre el desarrollo de embriones (Wang y col., 2013). Para ello, se adicionaron diferentes concentraciones de ghrelina (0, 3, 15 y 74 nM) al medio de MIV o al medio de CIV o, a ambos medios simultáneamente. Se observó que la tasa de clivaje y la formación de blastocistos disminuyeron cuando los ovocitos fueron madurados con una alta concentración de ghrelina (74 nM). Cuando esta misma concentración de ghrelina (74 nM) se adicionó al medio de MIV y CIV, también disminuyó la tasa de clivaje, la tasa de blastocistos y el número total de células por blastocisto en comparación con las concentraciones bajas (3-15 nM).

Dashtizad y col. (2011), a pesar de utilizar concentraciones suprafisiológicas de ghrelina en el medio de MIV (1, 15, 148 y 297 nM), no observaron diferencias significativas en la tasa de desarrollo de los blastocistos bovinos. Existen hallazgos contradictorios con respecto al efecto de la ghrelina sobre la maduración *in vitro* y el desarrollo embrionario posterior. Esto puede deberse en parte a la especie en estudio, la variación en las concentraciones utilizadas de ghrelina entre los diferentes grupos de investigación, y el momento o etapa de la PIV en la que se adiciona la hormona al medio. Zhang y col. (2007) evaluaron el efecto de ghrelina adicionada al medio de cultivo *in vitro* (CIV) (148 nM) y observaron que mejoraba la tasa de blastocistos porcinos. Por otro lado, el grupo de Kawamura y col., (2003) observaron que la suplementación con ghrelina en el medio de CIV (10-100 nM) inhibía el desarrollo preimplantacional de embriones en ratones. Este mismo grupo, más allá de agregar ghrelina al medio de CIV, trabajó con un antagonista del receptor GH-R. Observaron que en presencia del antagonista los efectos de

ghrelina fueron bloqueados, demostrando de esta forma la actividad de la hormona a través del receptor GHS-R.

En el último experimento, se evaluó la velocidad de desarrollo, el número de células por blastocisto al día 8 de cultivo y la tasa de eclosión (hatched), como una forma de evaluar la calidad embrionaria. Durante las primeras etapas del desarrollo, el embrión utiliza el ARNm y las proteínas que el ovocito acumuló a lo largo de su crecimiento y maduración (van den Hurk y Zhao, 2005). Luego, este material de origen materno comienza a degradarse y el desarrollo embrionario pasa a depender de la activación de la transcripción del genoma embrionario (Minami y col., 2007; Li y col., 2010). Esta transición materno-embrionaria en el bovino se produce durante el estadio de 8 a 16 células, por lo que las diferentes causas que pueden llevar a inhibir la activación del genoma embrionario produce el bloqueo del desarrollo en este estadio (Ferreira y col., 2009). Por lo tanto, el desarrollo hasta el estadio de blastocisto es un indicador utilizado para medir la capacidad de desarrollo alcanzada por los ovocitos luego de la maduración. Se ha observado que el momento de la formación del blastocisto es uno de los criterios más valioso para valorar el grado de diferenciación embrionaria (Van Soom y col., 1997). En el presente estudio, cuando se evaluó la velocidad de desarrollo de los blastocistos obtenidos al día 6, 7 y 8 de cultivo, madurados con diferentes concentraciones de ghrelina (20, 40 y 60 pM; Miura y col., 2004), no se observaron diferencias significativas con el control. Sin embargo, Dovolou y col., (2014), que también definieron las concentraciones de ghrelina de acuerdo con un estudio *in vivo* realizado en bovinos (Wertz-Lutz y col., 2006), observaron una menor velocidad de desarrollo de los blastocistos madurados con ghrelina con respecto al control. Es importante destacar que en este último trabajo se evaluó la formación de blastocistos a los días 7, 8 y 9.

Al cabo de 8 días de cultivo, los embriones llegan al estadio de blastocisto donde se pueden observar dos poblaciones celulares distintas: por un lado, las células del macizo celular interno (MCI) que darán origen a los tejidos fetales, y por otro, las células del trofoectodermo (TE) importantes en la implantación y posterior formación de la placenta y las membranas extraembrionarias. Se observó que la tasa y velocidad de formación de blastocistos, como también la capacidad de eclosión (hatched), están relacionados con el número de células del MCI y el TE de los embriones (Van Soom y col., 1997). El número total de células y la proporción de células del MCI y TE del blastocistos, son parámetros importantes para evaluar la calidad del embrión. En general, la relación del MCI respecto al número de células totales por blastocisto en los bovinos oscila entre 20 y 35% (Iwasaki y col., 1990; De la Fuente y King, 1997, Van Soom y col., 1997; Van de Velde y col., 1999). Ambas poblaciones celulares son indicadores de crecimiento y viabilidad del embrión (Van Soom y col., 1997). Cuando se evaluó al día 8 de cultivo el número total de células se observó que en los ovocitos madurados con ghrelina disminuyó significativamente el número total de células por blastocisto con respecto al control, de forma dosis dependiente. También se observó una clara disminución en la relación MCI/número total de células con el agregado de ghrelina al medio de MIV. Al parecer, si bien no se encontraron diferencias en la velocidad de desarrollo de los blastocistos, estos resultados muestran que ghrelina estaría afectando negativamente la calidad de los embriones. Por otra parte, dos grupos de trabajo evaluaron el efecto de ghrelina adicionada al medio de CIV, en ratón (Kawamura y col., 2003) y en porcino (Zhang y col., 2007). El grupo de Kawamura y col. (2003) observaron que los blastocistos cultivados con ghrelina tuvieron un número de células totales significativamente menor comparados con el control, al parecer resultado de la inhibición de la proliferación, tanto de células del MCI como del TE en igual proporción.

Por otra parte, Zhang y col. (2007) observaron un aumento en el número de células totales por blastocisto cuando fueron cultivados con altas concentraciones de ghrelina (148 nM), sin embargo, cuando evaluaron la relación entre MCI/número total de células observaron que esta relación era significativamente menor en los embriones cultivados con ghrelina con respecto al control. En otro trabajo llevado a cabo por Wang y col. (2013) en la especie ovina, adicionaron diferentes concentraciones de ghrelina (0, 3, 15 y 74 nM) al medio de MIV, CIV, y en ambos medios simultáneamente, en este estudio los autores evaluaron el número total de células por blastocisto al día 7 de cultivo, y reportaron que la ghrelina en concentración de 15 nM adicionada al medio de MIV y CIV simultáneamente, y solo al medio de CIV, aumentaba el número de células por blastocisto. Por otra parte, observaron que las altas concentraciones de la hormona (74 nM), con el mismo planteo anterior, disminuían significativamente el número de células por blastocisto. Es importante remarcar que los trabajos anteriormente citados (Kawamura y col., 2003; Zhang y col., 2007) adicionaron la ghrelina al medio en diferentes etapas de la PIV, en comparación a lo planteado en el presente estudio.

Nuestros resultados mostraron que los ovocitos bovinos madurados con el agregado de ghrelina al medio de MIV (20, 40 y 60 pM), presentaron una menor tasa de eclosión (*hatched*) con respecto al control (0 pM). Estos datos encuentran una relación con los resultados que observamos sobre el número de células totales y la relación de éstas con el MCI. El grupo de Kawamura y col., 2003, si bien trabajaron adicionando ghrelina al medio de CIV, observaron que las altas concentraciones de la hormona disminuían la tasa de eclosión de los embriones de ratón. Por otra parte, Dovoluo y col. (2014a y 2014b) en dos estudios, donde se utilizaron las mismas concentraciones de ghrelina, reportaron diferentes resultados con respecto a la tasa de eclosión de los embriones bovinos producidos *in vitro*.



Este mismo grupo, en un estudio previo no observaron diferencias en la tasa de eclosión de los embriones madurados *in vitro* con diferentes concentraciones de ghrelina (0, 60, 237 y 593 pM) (Dovolou y col., 2014a), mientras que en el otro trabajo reportaron un aumento en la tasa de eclosión de los embriones madurados con 237 y 593 pM de ghrelina (Dovolou y col., 2014b). Por último, Dashtizad y col. (2011) al agregar ghrelina al medio de MIV, no encontraron diferencias en la tasa de eclosión de los embriones bovinos, pese a utilizar concentraciones suprafisiológicas (Miura y col., 2004; Wertz-Lutz y col., 2006; Bradford y Allen, 2008).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis contribuyen a poder comprender y explicar cómo ghrelina puede afectar la maduración *in vitro* de los ovocitos bovinos y su impacto sobre el desarrollo embrionario posterior. El agregado de ghrelina al medio de MIV disminuyó la tasa de formación de pronúcleos, no modificó la tasa de clivaje, pero disminuyó la tasa de formación de blastocistos. Por otro lado, si bien no se observaron diferencias en la velocidad de desarrollo, el agregado de ghrelina disminuyó significativamente el número total de células por blastocisto, con una clara disminución en la relación MCI/número total de células, y afectó negativamente a la tasa de eclosión. Es decir que la presencia de ghrelina en altas concentraciones durante la maduración *in vitro* del ovocito bovino perjudica el desarrollo embrionario temprano. Si tomamos en cuenta los efectos de ghrelina sobre la maduración, los mecanismos de acción de la hormona a través de su receptor GHS-R1a (identificado tanto en los ovocitos como en las CC que lo rodean) vemos que evidentemente la presencia de ghrelina en altas concentraciones en el microambiente que rodea al COC provoca sobre éste un daño en las CC que afecta la capacidad de desarrollo posterior del ovocito, al parecer a través de alguna de las rutas de señalización que quedarían por investigarse con mayor profundidad.

## **Capítulo 5**

### **CONCLUSIONES GENERALES**

*Efecto de distintas concentraciones de ghrelina sobre la maduración de los ovocitos bovinos.*

- Se demostró que tanto la hormona ghrelina como su receptor (GHS-R1a) se expresan en los ovocitos y las células del *cumulus* de los COC bovinos, y que la expresión de ARNm del péptido cambia según la concentración de ghrelina en el medio.
- El agregado de ghrelina al medio de MIV no modifica el área de expansión ni el número de células del *cumulus* luego de la maduración.
- El agregado de ghrelina no afecta la tasa de maduración nuclear.
- La viabilidad de las células del *cumulus* que rodean al ovocito disminuyen significativamente con el agregado de ghrelina al medio de MIV.
- La tasa de apoptosis en las células del *cumulus* aumenta con el agregado de ghrelina al medio de MIV.
- El porcentaje de células del *cumulus* con daño en su ADN es mayor conforme aumentan las concentraciones de ghrelina en el medio de MIV.

*Efecto de distintas concentraciones de ghrelina sobre la capacidad de desarrollo posterior hasta el estadio preimplantacional de blastocisto.*

- La tasa de formación de pronúcleo disminuye con el agregado de ghrelina al medio de MIV.
- El agregado de ghrelina al medio de MIV no modifica la tasa de clivaje con respecto al control.

- El agregado de altas concentraciones de ghrelina (40 y 60 pM) al medio de MIV disminuye la tasa de blastocistos.
- En cuanto a la calidad de los embriones:
  - El agregado de ghrelina en el medio MIV no afecta a la velocidad de desarrollo.
  - El número de células por blastocisto disminuye conforme aumentan las concentraciones de ghrelina en el medio MIV.
  - El agregado de ghrelina en el medio MIV disminuye la relación MCI/número total de células.
  - La tasa de eclosión (haching) disminuye con el agregado de ghrelina al medio de MIV.

En consecuencia, todas las evidencias obtenidas demuestran que concentraciones crecientes de ghrelina perjudican el proceso de maduración de los ovocitos bovinos disminuyendo su capacidad de desarrollo embrionario posterior hasta el estadio preimplantacional de blastocisto.

## Bibliografía

- Abeydeera LR. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology* 2002; 57 (1): 256 - 273.
- Aerts JM, Bols PE. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod Domest Anim* 2010b; 45(1):180-7.
- Aerts JM, Bols PE. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim* 2010a; 45(1):171-9.
- Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol* 1976; 71: 680 – 686.
- Anderson LL, Jeftinija S, Scanes CG. Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229:291-302.
- Anderson R, Faessler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J, Wylie C. Mouse primordial germ cells lacking  $\alpha_1$  integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 1999; 126:1655–1664.
- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akimazu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Sirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4752-4758.

- Arosh, J.A.; Banu, S.K.; Chapdelaine, P; Madore, E; Sirois, J; Fortier, M.A. May prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology* 2004; 145(5):2551-2560.
- Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl-ghrelin. *Gut* 2005; 54:18-24.
- Bai R, Zhao P, Cao G, Wen S, Li Q, Meng Q. Ghrelin promotion of oocyte maturation via ERK1/2 pathway in ovis aries. *Cell Mol Biol* 2012; 5; 58 Suppl: 1797-802.
- Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E, and Graziani A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 2002; 159, 1029–1037.
- Ball P. *Reproduction in Cattle* (3a ed.), Oxford, United Kingdom: Blackwell Publishing 2004.
- Balla T. Phosphoinositide-derived messengers in endocrine signaling. *J Endocrinol* 2006; 188:135-53.
- Banks WA, Tschop M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood brain barrier is determined by its unique primary structure. *Journal of Pharmacology Exp Ther* 2002; 302: 822–827.
- Barb CR, Kraeling RR, Rampacek GB, Barnett JB. Neuropeptide Y: a possible link between LH and GH in the gilt. *J Anim Sci* 1999; 77 (Suppl. 1), 223.
- Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, Suominen JS, Roa J, Gaytan M, Aguilar E, Dieguez C, Toppari J, Tena-Sempere M. Ghrelin inhibits the proliferative activity of

- immature Leydig cells *in vivo* and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Endocrinology* 2004; 145:4825-34.
- Barreiro ML, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol* 2004; Vol 226: Pages 1–9.
- Bauman DE. Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. In: Cronje PJ, editor. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Growth and Reproduction*. CAB Publishing; New York: 2000; pp. 311–327.
- Beam SW and Butler WR. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod* 1997; 56:133–142.
- Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, MacColl GS, Keen JN, Bouloux PM, Mikhailidis DP, Bruckdorfer KR, Vanderpump MP, Srai KS. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 2003; 278:8877-80.
- Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van Der Ploeg LH, Heck JV. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 2000; 43:4370-6.
- Bell AW. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci* 1995; 73:2804-2819.
- Bertherat J, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J. Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur J Endocrinol* 1995; 132:12-24.

- Bilodeau-Goeseels S and Kastelic JP. Factors affecting embryo survival and strategies to reduce embryonic mortality in cattle. *Can J Anim Sci* 2006; 83, 659-671.
- Bilodeau-Goeseels S. Effect of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. *Theriogenology* 2006; 66, 297-306.
- Bonfili L, Cuccioloni M, Cekarini V, Mozzicafreddo M, Alessandro Palermo F, Cocci P, Angeletti M, Eleuteri AM. Ghrelin induces apoptosis in colon adenocarcinoma cells via proteasome inhibition and autophagy induction. *Apoptosis*. 2013; 18:1188–1200.
- Borg N, Holland M. The effect of glycosaminoglycans on rat gametes in vitro and the associated signal pathway. *Reproduction* 2008; 135 (3): 311 - 319.
- Borowczyk E, Johnson ML, Bilski JJ, Borowicz PP, Redmer DA, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. Expression of gap junctional connexins 26, 32, and 43 mRNA in ovarian preovulatory follicles and corpora lutea in sheep. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84(10):1011-20.
- Bossis, I., Wettemann, R.P., Welty, S.D., Vizcarra, J.A., Spicer, L.J., Diskin, M.G.. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. *J Anim Sci* 1999, 77:1536- 1546.
- Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, Chang D, Hong A, Chang K. Structure activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 1980; 106: 663-7.
- Bradford BJ and Allen MS. Negative energy balance increases periprandial ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol* 2008; 34:196-203.
- Braw-Tal R, Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1997; 109(1):165-71.



- Broglia F, Gottero C, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, Me E, Riganti F. Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycemia but unaffected by glucagon and arginine in humans. *Clin Endocrinology* 2004; 61 (4): 503-509.
- Brunet S, Maro B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction* 2005; 130(6):801-11.
- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 20.
- Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR), trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29, 23-39.
- Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:449-457.
- Butler, W. R.; Smith, R.D. Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1989; 72: 767-783.
- Camaioni A, Hascall VC, Yanagishita M, Salustri A. Effects of exogenous hyaluronic acid and serum on matrix organization and stability in the mouse *cumulus* cell-oocyte complex. *J Biol Chem* 1993; 268 (27): 20473 - 20481.
- Caminos JE, Gualillo O, Lago F, Otero M, Blanco M, Gallego R, Garcia-Caballero T, Goldring MB, Casanueva FF, Gomez-Reino JJ, Dieguez C. The endogenous growth hormone secretagogue (ghrelin) is synthesized and secreted by chondrocytes. *Endocrinology* 2005; 146:1285-92.

- Caminos JE, Nogueiras R, Blanco M. Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 2003a; 144: 5089-97.
- Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 2003b; 144: 1594–1602.
- Camiña JP. Cell biology of the ghrelin receptor. *J Neuroendocrinology*. 2006; 18:65-76.
- Carrillo J. Manejo de un rodeo de cría. INTA. CERBAS EEA Balcarce 1997.
- Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, Tarabra E, Allia E, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Papotti M, Muccioli G. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. *Eur J Endocrinol* 2004; 150:173-84.
- Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1738–1745.
- Cavestany D. Efecto de las características del reinicio de la actividad ovarica posparto en la eficiencia reproductiva de vacas Holstein en pastoreo. *Arch med vet* 2001; 33 (2), 17-20.
- Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR, Lucy MC, Martin GB, Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW, Webb R. Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Sci* 2007; 90:4022-32.

- Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29 (3-4): 323-33.
- Chase CC, Kirby CJ, Hammond AC, Olson TA, Lucy MC. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone deficiency. *J Anim Sci* 1998; 76: 212–219.
- Chen C, Zhang J, Vincent JD, Israel JM. Sodium and calcium currents in action potentials of rat somatotroph: their possible functions in growth hormone secretion. *Life Sci* 1990; 46:983-9.
- Chen L, Russell PT, Larsen WJ. Functional significance of *cumulus* expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the *cumulus* mass. *Mol Reprod Dev* 1993; 34: 87 – 93.
- Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology* 2007; 148:3580–3590.
- Chung H., Seo S., Moon M and Park S. Phosphatidylinositol-3-kinase / Akt / glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and ERK1/2 pathways mediate protective effects of acylated and unacylated ghrelin against oxygen–glucose deprivation- induced apoptosis in primary rat cortical neuronal cells. *J. Endocrinol* 2008, 198, 511–521.
- Chung YC, Kim CK, Kim HR, Lee JH, Chung JT. Effect of individual variation in acrosome reaction of bull sperm on in vitro fertilization and embryonic development. *J Anim Sci* 1991; 69 (1): 427.
- Cohen J. Assisted hatching of human embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1991; 8(4):179–90.

- Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26:249–61.
- Combe, S., Hansel, W. Plasma luteinizing hormone (LH) and progesterone levels in heifers on restricted energy intakes. *J Anim Sci* 1973, 37:728-733.
- Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25 Suppl 5:S63-7.
- Corn CM, Hauser-Kronberger C, Moser M, Tews G, Ebner T. Predictive value of *cumulus* cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. *Fertil Steril* 2005; 84: 627–633.
- Cortvrindt R, Hu Y, Smitz J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiating factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulated hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod* 1998; 13: 1292–1303.
- Crespo MA, González Matías LC, Lozano MG, Paz SF, Pérez MR, Gago EV, Ferrer FM. Gastrointestinal hormones in food intake control. *Endocrinol Nutr* 2009; 56 (6):317-30.
- Crespo P, Cachero TG, Xu N, Gutkind JS. Dual effect of beta-adrenergic receptors on mitogen-activated protein kinase. Evidence for a beta gamma-dependent activation and a G alpha s-cAMP-mediated inhibition. *J Biol Chem* 1995; 270(42):25259-65.
- Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E297-304.

- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50:1714-9.
- Dashtizad M, Wahid H, Mami OA, Rosnina Y, Daliri M, Hajarian H. Effects of ghrelin on in vitro nuclear maturation and subsequent embryo development of immature bovine oocytes. *J Anim Vet Adv* 2011; 10, pp. 2797–2801.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans, *Endocrinology* 2000; 141: 4255–4261.
- De Felici M, Scaldaferri ML, Farini D. Adhesion molecules for mouse primordial germ cells. *Front Biosci.* 2005; 10:542-51.
- De la Fuente, R. & Allan King, W. Use of a chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. *Zygote* 1997; 5, 309–20.
- Deaver SE, Hoyer PB, Dial SM, Field ME, Collier RJ, Rhoads ML. Localization of ghrelin and its receptor in the reproductive tract of Holstein heifers. *J Dairy Sci* 2013; 96(1):150-7.
- DeFea, K.A., Vaughn, Z.D., O'Bryan, E.M., Nishijima, D., Dery, O. and Bunnett, N.W. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a b-arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97, 11086-11091.
- Delhanty PJ, van der Eerden BC, van der Velde M, Gauna C, Pols HA, Jahr H, Chiba H, van der Lely AJ, van Leeuwen JP. Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human

- osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways in the absence of GHS-R1a. *J Endocrinol* 2006; 188:37-47.
- DeLong, M. J. Apoptosis: a modulator of cellular homeostasis and disease states. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 842: 82–90.
- Dickin JC, Thue TD and Buchanan FC. An alternative splice site in ghrelin is missing in ruminants. *Anim Genet* 2004; 35:411–412.
- Dieci C, Lodde V, Labreque R, Dufort I, Tessaro I, Sirard MA, Luciano AM. Differences in *cumulus* cell gene expression indicate the benefit of a pre-maturation step to improve in-vitro bovine embryo production. *Mol Hum Reprod* 2016; 22(12):882-897.
- Dornonville C, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Hakanson R. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 2001; 99:141-150.
- Dovolou E, Messinis IE, Periquesta E, Dafopoulos K, Gutierrez-Adan A, Amiridis GS. Ghrelin accelerates in vitro maturation of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* 2014a; 49(4):665-72.
- Dovolou E, Periquesta E, Messinis I, Tsiligianni T, Dafopoulos K, Gutierrez-Adan A, Amiridis GS. Daily supplementation with ghrelin improves in vitro bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. *Theriogenology* 2014b; 81(4):565-71.
- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt R, Smitz J. Roles of kit and kit ligand in ovarian function. *Rev Reprod* 2000; 5: 143–152.
- Driancourt MA. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 2001; 55: 1211–1239.

- Du C, Xilingaowa, Cao G, Wang C, Li H, Zhao Y, SiqingaowaCJ. Expression of the orexigenic peptide ghrelin in the sheep ovary. *Domest Anim Endocrinol* 2009; 36:89–98.
- Dupont J, Maillard V, Coyral-Castel S, Ram'e, C and Froment P. Ghrelin in female and male reproduction, *International Journal of Peptides* 2010; Art ID 158102, 8 pages.
- Dupré A, Haccard O, Jessus C. Mos in the oocyte: how to use MAPK independently of growth factors and transcription to control meiotic divisions. *J Signal Transduct* 2011; 350412/15.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009; 30(6):624-712.
- Elder K, Dale B. Sperm-oocyte interaction. En: *In vitro* fertilization. Tercera edición. Cambridge University Press, UK, 2011.
- Eppig J. Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. En: Browder L *Developmental biology: A comprehensive synthesis. Oogenesis*. Vol 1. Plenum Press, New York, 1985, p. 313-347.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(5):2890-4.
- Eppig JJ, Wigglesworth K. Development of mouse and rat oocytes in chimeric reaggregated ovaries after interspecific exchange of somatic and germ cell components. *Biol Reprod* 2000; 63: 1014–1023.
- Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 1991; 13: 569–574.
- Eppig JJ. The Relationship between *Cumulus* Cell Oocyte Coupling, Oocyte Meiotic Maturation, and *Cumulus* Expansion. *Dev Biol* 1982; 89:268-272.

- Evans JP, Robinson DN. The Spatial and Mechanical Challenges of Female Meiosis. *Mol Reprod Dev* 2011; 78: 769-777.
- Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 2003; 78(3-4):203–216.
- Fair T. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22(1):13-20.
- Fan HY, Sun QY. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals. *Biol Reprod* 2004; 70: 535 – 547.
- Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254-255:127-32.
- Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E, Pinilla L. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neurosci Lett* 2004; 362, 103–107.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 2009; 71:836-848.
- Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2011; 124(3-4):163-9.
- Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O’Gaora P, Lonergan P, Roche JF. Progesterone regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol Reprod* 2009; 81:784–794.
- Fortune JE, Yang MY, Muruvi W. The earliest stages of follicular development: follicle formation and activation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2010; 67:203-16.



- Frago LM, Baquedano E, Argente J and Chowen J.A. Neuroprotective Actions of Ghrelin and Growth Hormone Secretagogues. *Front Mol Neurosci* 2011; 4: 23.
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51:319-51.
- Fukui Y, Sonoyama T, Mochizuki H, Ono H. Effect of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro, *Theriogenology* 1990, 34: 575 - 591.
- Fulka J, First NL, Moor RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(1): 41-9.
- Furnus CC, de Matos DG, Moses DF. *Cumulus* expansion during in vitro maturation of bovine oocytes: relationship with intracellular glutathione level and its role on subsequent embryo development. *Mol Reprod Dev* 1998; 51(1):76-83.
- Furnus CC, de Matos DG, Picco S, García PP, Inda AM, Mattioli G, Errecalde AL. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008; 109: 88 – 99.
- Furuta M, Funabashi T, Kimura F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:780-5.
- Gabrielli BG, Roy LM, Maller JL. Requirement of cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase arrest. *Science* 1993; 259: 1766-1769..
- García MC, López M, Alvarez CV, Casanueva F, Tena-Sempere M, Diéguez C. Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction* 2007; 133(3):531-40.
- Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and

- somatic cells: Amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulated development. *Biol Reprod* 1994; 50: 390-400.
- Garrido C, Saule S, Gospodarowicz D. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in bovine granulosa cells. *Growth Factors* 1993; 8: 109–117.
- Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena- Sempere M. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growthhormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:400-9.
- Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. Immunolocalizationof ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagoguereceptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:879-887.
- Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Marrocco T, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M. The antiproliferative effect of synthetic peptidyl GH secretagogues in human CALU-1 lung carcinoma cells. *Endocrinology* 2002; 143:484–491.
- Ghigo E, Arvat E, Muccioli G, Camanni F. Growth hormone-releasing peptides. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 445-60.
- Gigli I, Russo A, Agüero A. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. In *Vet* 2006; (6):183-204.
- Gil Corbalán MA. Influencia de diferentes condiciones de cocultivo sobre la fecundación y la producción in vitro de embriones porcinos. Tesis doctoral. Fac Vet Univ Murcia 2001.

- Gil Villa AM, Cardona-Maya WD, Cadavid Jaramillo AP. Muerte embrionaria temprana: ¿tiene influencia el factor masculino? Arch Esp Urol 2007; 60 (9): 1057 - 1068.
- Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. Anim Reprod Sci 2004; 82-83:431-46.
- Gilchrist Robert B, Lane M and Thompson Jeremy C. Oocytes-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. Human reproduction Update 2008; Vol 14. N°2. 159-177.
- Glander HJ y Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. Mol Hum Reprod 1999; 5(2):109 – 115.
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GH-R, in humans. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:2988.
- Godin I, Wylie C. TGF  $\beta$ 1 inhibits proliferation and has a chemotactic effect on mouse primordial germ cells in culture. Development 1991; 113: 1451-1457.
- Gonzales DS, Jones JM, Pinyopummintr T, Carnevale EM, Ginther OJ, Shapiro SS, et al. Trophectoderm projections: a potential means for locomotion, attachment and implantation of bovine, equine and human blastocysts. Hum Reprod 1996; 11:2739–45.
- Gordon A.C., He C.L., Smith S., Fissore R. A.: Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. Mol Reprod Dev 2001; 59,106-114.

- Gröhn YT, Hertl JA, Harman JL. Effect of early lactation milk yield on reproductive disorders in dairy cows. *Am J Vet Res* 1994; 55, 1521–1528.
- Grummer RR. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci* 1995; 73:2820-33.
- Gualillo O, Caminos J, Blanco M, et al. Ghrelin, a novel placental- derived hormone. *Endocrinology* 2001; 142: 788-94.
- Gupta SK, Bhandari B. Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J Androl* 2011; 13(1): 97-105.
- Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:6320-5.
- Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 1997; 414 (3): 552-556.
- Han SJ, Conti M. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle* 2006; 5(3):227-31.
- Hartshorne GM. In vitro culture of ovarian follicles. *Rev Reprod* 1997; 2: 94–104.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Imai H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. *Biol Reprod* 2002; 66 (6):1696-701.
- Hashimoto S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *J Reprod Dev* 2009; 55(1):1 - 10.
- Hattori N, Saito T, YagyuT, Jiang B, Kitagawa K, Inagaki C. GH, GH Receptor, GH Secretagogue Receptor, and Ghrelin Expression in Human T Cells, B Cells, and Neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; Volume 86 Issue 9.

- Hayashida T, Murakami K, Mogi K, Nishihara M, Nakazato M, Mondal MS, Horii Y, Kojima M, Kangawa K, Murakami N. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 21(1):17-24.
- Heikinheimo O, Gibbons WE. The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine. *Mol Hum Reprod* 1998; 4 (8): 745 – 756.
- Henao G. Reactivacion ovarica postparto en bovinos. *Rev Fac Nac Agron Medellín* 2001; Vol 54, Número 1 y 2, p. 1285-1302.
- Herbert M, Levasseur M, Homer H, Yallop K, Murdoch A, McDougall A. Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nature Cell Biology* 2003; 5: 1023–1025.
- Hess KA, Chen L, Larsen WJ. Inter-alpha-inhibitor binding to hyaluronan in the *cumulus* extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. *Biol Reprod* 1999; 61: 436 – 443.
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43-101.
- Hofmann K. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 2000; 25:111-2.
- Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor--identification of a potent inverse agonist. *Mol Endocrinol* 2003; 17(11):2201-10.
- Holst B, Holliday ND, Bach A, Elling CE, Cox HM, Schwartz TW. Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem* 2004; 279(51):53806-17.

- Hosoda H, Kangawa K. Ghrelin measurement: present and perspectives. In: Ghigo E. Ghrelin. USA: Kluwer Academic Publishers 2004; 225-236.
- Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Mol Interv* 2002; 2(8):494-503.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000b; 279:909-13.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 2000a; 275: 21995-2000.
- Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by posttranslational processing. *J Biol Chem* 2003; 278:64-70.
- Host E, Gabrielsen A, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. Apoptosis in human *cumulus* cells in relation to zona pellucida thickness variation, maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2002; 77:511–515.
- Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Supurlock ME. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci* 1998; 76: 1405-1420.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathinghi DJS, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, and Ploeg LHT. A receptor in

- pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273:974–977.
- Hughes FJ, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology* 1991; 129: 2415–2422.
- Iglesias MJ, Piñeiro R, Blanco M, Gallego R, Dieguez C, Gualillo O, Gonzalez- Juanatey JR, Lago F. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2004; 62:481-8.
- Ikeda S, Imai H, Yamada M. Apoptosis in *cumulus* cells during in vitro maturation of bovine *cumulus*-enclosed oocytes. *Reproduction* 2003; 125(3):369-76.
- Iqbal J, Kurose Y, Canny B and Clarke IJ. Effects of central infusion of ghrelin on food intake and plasma levels of growth hormone, luteinizing hormone, prolactin, and cortisol secretion in sheep. *Endocrinology* 2006; 147:510-9.
- Itoh F, Komatsu T, Kushibiki S and Hodate K. Effects of ghrelin injection on plasma concentrations of glucose, pancreatic hormones and cortisol in Holstein dairy cattle. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol* 2006; 143:97–102.
- Iwasaki, S., Yoshiba, N., Ushijima, H., Watanabe, S. & Nakahara, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Fertil* 1990; 90, 279–84.
- Jeffery PL, Duncan RP, Yeh AH, Jaskolski RA, Hammond DS, Herington AC, Chopin LK. Expression of the ghrelin axis in the mouse: an exon 4-deleted mouse proghrelinvariant encodes a novel C terminal peptide. *Endocrinology* 2005; 146:432-40.

- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428: 145–150.
- Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumegai J, Tanikawa H, Nakamura A, Honda Y, Sato T, Tanaka T. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 2003; 144, 2623–2633.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26: 239–257.
- Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park H, Ryu JW, Pak YK, Park JY, Lee KU, Kim SY, Lee HK, Kim YB, and Park, KS. The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2004; 18, 2291–2301.
- Kim SW, Her SJ, Park SJ, Kim D, Park KS, Lee HK, Han BH, Kim MS, Shin CS, and Kim SY. Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 2005; 37, 359–369.
- Kimura F, Bonomi LM, Schneyer AL. Follistatin regulates germ cell nest breakdown and primordial follicle formation. *Endocrinology* 2011; 152(2):697-706.
- Kojima M and Kangawa K. Ghrelin: Structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85:495–522.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-60.
- Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12:118 –122.
- Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 2004; 82 (Suppl. E.): 14 – 23.



- Krzymowski T, Stefańczyk-Krzymowska S. The role of the endometrium in endocrine regulation of the animal oestrous cycle. *Reprod Domest Anim* 2008; 43(1):80-91.
- Lancaster R, Catt J, Rhodes S, Polege C. Bull and breed specific effects of heparin-capacitated bovine sperm on in vitro of in vitro matured follicular oocytes. *Proceedings of the Six European Congress of the Embryo Transfer Association* (Lyon), Francia, 1990, p. 166.
- Larsen M, Relling AE, Reynolds CK, Kristensen NB. Effect of abomasal glucose infusion on plasma concentrations of gut peptides in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci* 2010; 93:5729-36.
- Ledan E, Polanski Z, Terret M-E, Maro B. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Developmental Biology* 2001; 232: 400–413.
- Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(12):6842-7.
- Lee JH, Kim TJ, Kim JW, Yoon JS, Kim H, Lee KM. The Anti-apoptotic Effect of Ghrelin on Restraint Stress-Induced Thymus Atrophy in Mice. *Immune Network* 2016; 16(4):242-8.
- Lefkowitz, R.J. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signalling and desensitisation. *J Biol Chem* 1998; 273, 18677-80.
- Li E, Kim Y, Kim S, Sato T, Kojima M, Park S. Ghrelin stimulates proliferation, migration and differentiation of neural progenitors from the subventricular zone in the adult mice. *Exp Neurol* 2014; 252:75-84.

- Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. *Development* 2010; 137: 859 - 870.
- Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 2007 Sep; 21(9):2037-55.
- Liang QH, Liu Y, Wu SS, Cui RR, Yuan LQ, Liao EY. Ghrelin inhibits the apoptosis of MC3T3-E1 cells through ERK and AKT signaling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 272(3):591-7.
- Lin YH and Hwang JL. *In vitro* maturation of human oocytes. *Taiwanese journal obstetrics and gynecology* 2006. Vol 45. N° 2. 95-99.
- Liu S, Li Y, Feng HL, Yan JH, Li M, Ma SY, Chen ZJ. Dynamic modulation of cytoskeleton during in vitro maturation in human oocytes. *Am J Obst Gynecol* 2010. 20: 151-7.
- Livak KJ y Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001; 25, 402-408.
- Lorenzi T, Meli R, Marzioni D, Morroni M, Baragli A, Castellucci M, Gualillo O, Muccioli G. Ghrelin: a metabolic signal affecting the reproductive system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20(2):137-52.
- Luciano AM, Modina S, Gandolfi F, Lauria A, Armstrong DT. Effect of cell-to-cell contact on in vitro deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor *Biol Reprod* 2000; 63: 1580– 1585.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL and Thatcher WW. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 1992; 70:3615–3626.

- Lucy MC. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 64:237-54.
- Lucy MC. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 Suppl 2:31-9.
- Lucy MC. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reprod Suppl* 2003; 61:415-427.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S.G., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. Beta-arrestin-dependent formation of beta2-adrenergic receptor protein kinase complexes. *Science* 1999; 283, 655-661.
- Machaty Z. Signal transduction in mammalian oocytes during fertilization. *Cell Tissue Res* 2016; 363(1):169-83.
- Mao J, Wu G, Smith MF, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biol Reprod* 2002; 67: 1197–1203.
- Marangos P, Carroll J. The dynamics of cyclinB1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Reproduction* 2004; 128(2):153-62.
- Martínez Madrid B. Estudio de la fecundación “in vitro” en porcino: reducción de la poliespermia y optimización de la producción “in vitro” de embriones. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 2002.
- Masui Y, Clark H. Regulation of oocyte maturation. *Int Rev Cytol* 1979; 57: 185-282.

- Masui Y. A quest for cytoplasmic factors that control the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* 1996; 2: 1 - 13.
- Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morozumi N, Minamitake Y, Tanaka S, Matsuo H, Kojima M, Hayashi Y, Kangawa K. Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287:142-6.
- Mattson BA, Albertini DF. Oogenesis: Chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 374-384.
- McGee EA, Hueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21(2):200-14.
- McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 1997; 11:415-23.
- Méduri G, Charnaux N, Driancourt MA, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(5):2266-76.
- Meizel S. Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat* 1985; 174: 285 – 302.
- Miller DW, Harrison JL, Brown YA, Doyle U, Lindsay A, Adam CL. Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3, pp. 60.
- Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *J Reprod Dev* 2007; 53: 707 - 715.

- Miura H, Tsuchiya N, Sasaki I, Kikuchi M, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Ohnami Y. Changes in plasma ghrelin and growth hormone concentrations in mature Holstein cows and three-month-old calves. *J Anim Sci* 2004; 82(5):1329-33.
- Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, Hong A, Newlander K. Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides. *Endocrinology* 1984; 114:1531-6.
- Moniruzzaman M, Miyano T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. *J Reprod Dev* 2010; 56(6):559-66.
- Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J Jr. Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update* 1998; 4 (3): 223 - 236.
- Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fert* 1977; 49: 101- 109.
- Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 2000; 486:213-216.
- Morrison CD, Daniel JA, Buff PR, Keisler DH. Continuous, intracerebroventricular infusion of neuropeptide Y induces a prolonged suppression of LH. *J Anim Sci* 1999; 77 (Suppl. 1), 216.
- Nagyova E, Scsukova S, Nemcova L, Mlynarcikova A, Yi YJ, Sutovsky M, Sutovsky P. Inhibition of proteasomal proteolysis affects expression of extracellular matrix components and steroidogenesis in porcine oocyte-*cumulus* complexes. *Domest Anim Endocrinol* 2012; 42 (1): 50 - 62.

- Nakagawa E, Nagaya N, Okumura H, Enomoto M, Oya H, Ono F. Hyperglycemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clinical Science* 2002; 103 (3): 325–328.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-8.
- Nanzer AM, Khalaf S, Mozid AM, Fowkes RC, Patel MV, Burrin JM, Grossman AB & Korbonits M. Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Endocrinol* 2004; 151 233–240.
- Nass R, Gilrain J, Anderson S, Gaylinn B, Dalkin A, Day R, Peruggia M, Thorner MO. High plasma growth hormone (GH) levels inhibit expression of GH secretagogue receptor messenger ribonucleic acid levels in the rat pituitary. *Endocrinology* 2000; 141:2084-9.
- Nebreda A.R., Ferby I. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12, 666-675.
- Nogueiras R, Tovar S, Mitchell SE, Rayner DV, Archer ZA, Dieguez C, Williams LM. Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes* 2004; 53:2552-8.
- Norbury CJ, Zhivotovsky B. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 2004; 23(16): 2797-808.
- Nurse O. Universal control of mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 1990; 334: 503-508.

- Ohashi S, Naito K, Sugiura K, Iwamori N, Goto S, Naruoka H, Tojo H. Analyses of mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod* 2003; 68(2):604-9.
- Oktem O, Oktay K. Stem cells: a perspective on oocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127, 20–26.
- Olive PL, Durand RE, Jackson SM, Le Riche JC, Luo C, Ma R, McLaren DB, Aquino-Parsons C, Thomson TA, Trotter T. The comet assay in clinical practice. *Acta Oncol* 1999; 8: 839 – 844.
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, Glander HJ, Agarwal A. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 71: 1828 – 1837.
- Palma G. Producción in vitro de embriones bovinos. En: Palma G. *Biotecnología de la reproducción*. Balcarce, Argentina: Ed. Reprobiotec 2001; P 257-259.
- Parrish JJ, Parrish JL, First NL. Effect of swim-up separation and heparin pretreatment of frozen-thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Biol Reprod* 1984; 30 (1): 112.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. In vitro fertilization of bovine oocytes using heparine treated and swim-up separated frozen-thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization. *Theriogenology* 1985b; 23: 216.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, First NL. Role of heparine in bovine sperm capacitation. *Biol Reprod* 1985a; 32 (1): 211.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988; 38: 1171 - 1180.

- Pekic S, Pesko P, Djurovic M, Miljic D, Doknic M, Glodic J, Dieguez C, Casanueva FF, Popovic V. Plasma ghrelin levels of gastrectomized and vagotomized patients are not affected by glucose administration. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64:684-688.
- Pepling ME, Spradling AC. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 1998; 125(17):3323-3328.
- Perez-Tilve D, Nogueiras R, Mallo F, Benoit SC, and Tschoep M. Gut hormones ghrelin, PYY, and GLP-1 in the regulation of energy balance and metabolism. *Endocrine* 2006; 29:61-71.
- Perry AC, Verlhac MH. Second meiotic arrest and exit in frogs and mice. *EMBO Rep* 2008; 9(3):246-51.
- Perry SJ and Lefkowitz RJ. Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. *Trends Cell Biol* 2002; 12(3):130-8.
- Pierce KL, Luttrell M and Lefkowitz RJ. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 2001; 20, 1532-1539.
- Pincus G, Enzmann E. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro I. The activation of ovarian eggs. *J Exp Med* 1935; 62: 665-675.
- Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A, Marcos R. Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res* 1999; 441(1):115-27.
- Pong SS, Chaung LY, Dean DC, Nargund RP, Patchett AA, Smith RG. Identification of a new G-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 57-61.



- Popelkova M, Sirotkin AV, Bezakova A, Makarevic AV, Pivko J, Kacmarik J, Kovac G. Effect of IGF-I, leptin, ghrelin and MAPK-ERK on nuclear maturation of bovine oocytes. *Bull Vet Inst Pulawy* 2006; 50, 179–181.
- Popovic V, Miljic D, Pekic S, Pesko P, Djurovic M, Doknic M, Damjanovic S, Micic D, Cvijovic G, Glodic J, Dieguez C, Casanueva FF. Low plasma ghrelin level in gastrectomized patients is accompanied by enhanced sensitivity to the ghrelin-induced growth hormone release. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:2187-91.
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 1992; 11:1-20.
- Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Vol 1 Academic Press, USA 2006, p. 383-424.
- Rak-Mardyla A, Gregoraszczuk E. Effect of ghrelin on proliferation, apoptosis and secretion of progesterone and hCG in the placental JEG-3 cell line. *Reprod Biol* 2010b; 10(2):159-65.
- Rak-Mardyla A, Gregoraszczuk E. ERK 1/2 and PI-3 kinase pathways as a potential mechanism of ghrelin action on cell proliferation and apoptosis in the porcine ovarian follicular cells. *J Physiol Pharmacol* 2010a; 61(4):451-8.
- Rak-Mardyla A, Gregoraszczuk EL, Karpeta A, Duda M. Expression of ghrelin and the ghrelin receptor in different stages of porcine corpus luteum development and the inhibitory effects of ghrelin on progesterone secretion, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) activity and protein expression. *Theriogenology* 2012; 77(8):1505-12.

- Rak-Mardyla A, Szczepankiewicz D, Gregoraszczuk EL. Expression of ghrelin receptor, GHR-1a, and its functional role in the porcine ovarian follicles. *Growth Horm IGF Res* 2009; 19(1):68-76
- Rana SV. Metals and apoptosis: recent developments. *J Trace Elem Med Biol* 2008; 22(4):262-84.
- Relling AE, Loerch SC and Reynolds CK. Plasma ghrelin and oxyntomodulin concentrations in lactating dairy cows receiving abomasal soybean oil, corn starch and casein infusions. *Domest Anim Endocrinol* 2010a; 38:284–288.
- Relling AE, Mattioli G. Hormonas gastrointestinales, su rol en la producción animal. *Revista Argentina de Producción Animal* 2010; 30:199-210.
- Relling AE, Pate JL, Reynolds CK, Loerch SC. Effect of feed restriction and supplemental dietary fat on gut peptide and hypothalamic neuropeptide messenger ribonucleic acid concentrations in growing wethers. *J Anim Sci.* 2010b; 88:737-48.
- Robinson RS, Hammond AJ, Wathes DC, Hunter MG, Mann GE. Corpus luteum-endometrium-embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. *Reprod Domest Anim* 2008; 43(suppl 2):104–112.
- Roche JF. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 2006b; 96:282-96.
- Roche JR, Blache D, Kay JK, Miller DR, Sheahan AJ, Miller DW. Neuroendocrine and physiological regulation of intake with particular reference to domesticated ruminant animals. *Nutr Res Rev* 2008; 21:207-34.
- Roche JR, Sheahan AJ, Chagas LM and Berry DP. Short communication: genetic election for milk production increases plasma ghrelin in dairy cows. *J Dairy Sci* 2006a; 89:3471-5.

- Roche, J.F., Mackey, D., Diskin, M.D. Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci* 2000, 60-61:703-712.
- Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod* 2010; 82(6):1021-9..
- Rutter B, Russo AF. Fundamentos de la Fisiología de la Gestación y el Parto de los Animales Domésticos. Buenos Aires, Argentina. Ed Eudeba 2002; ISBN: 9502312473. P247.
- Sakata I, Nakamura K, Yamazaki M, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T. Ghrelin producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 2002; 23:531–536.
- Sakata I, Yang J, Lee CE, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Elmquist JK, Zigman JM. Colocalization of ghrelin O-acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 297: 2009.134-41.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse *cumulus* cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J Biol Chem* 1989; 264: 13840 – 13847.
- Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem* 2012; 151 (2):119-28.
- Schroeder AC, Eppig JJ. The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Developmental Biology* 1984; 102: 493-497.
- Scrimgeour K, Gresham MJ, Giles LR, Thomson PC, Wynn PC, Newman RE. Ghrelin secretion is more closely aligned to energy balance than with feeding behaviour in the grower pig. *J Endocrinol* 2008; (1):135-45.

- Seino T, Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Kurachi H. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril* 2002; 77 (6): 1184 - 1190.
- Shanado Y, Kometani M, Uchiyama H, Koizumi S, and Teno N. Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:1487-94.
- Shimizu T, Tetsuka M, Miyamoto A, Uchida T. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates the expression of Pin1, a peptidyl-prolyl isomerase, in the bovine granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* 2007; 32(3):226-34.
- Silke, V., Diskin, M.G., Kenny, D.A., Boland, M.P., Dillon, P, Mee, J.E, Sreenan, J.M. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2002, 71:1-12.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988; 175: 184 - 191.
- Sirotkin AV, Grossmann R, Maria-Peon MT, Roa J, Tena-Sempere M, Klein S. Novel expression and functional role of ghrelin in chicken ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 257–258, pp. 15–25.
- Smith RG, Leonard R, Bailey AR, Palyha O, Feighner S, Tan C, McKee KK, Pong SS, Griffin P, and Howard A. Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine* 2001; 14, 9-14.
- Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr rev* 1997; 8:621-645.

- Smits JE, Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 2002; 123(2):185–202.
- Snijders SE, Dillon P, O'Callaghan D, Boland MP. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* 2000; 53:981-989.
- Solc P, Schultz RM, Motlik J. Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(9):654-64.
- Solcia E, Rindi G, Buffa R, Fiocca R, Capella C. Gastric endocrine cells: types, function and growth. *Regul Pept* 2000; 93:31-5.
- Song Y, Leonard SW, Traber MG, Ho E. Zinc deficiency affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J Nutr* 2009; 139 (9): 1626 -1631.
- Sugino T, Hasegawa Y, Kikkawa Y, Yamaura J, Yamagishi M, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K and Terashima Y. A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep. *Biochem Biophys Res Commun*.2002; 295:255-60.
- Sun QY, Nagai T. Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. *J Reprod Dev* 2003; 49: 347 – 359.
- Suzuki H, Sasaki Y, Shimizu M, Matsuzaki M, Hashizume T, Kuwayama H. Ghrelin and leptin did not improve meiotic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. *Reprod Domest Anim* 2010; 45(5):927-30.
- Tajima K, Orisaka M, Yata H, Goto K, Hosokawa K, Kotsuji F. Role of granulosa and theca cell interactions in ovarian follicular maturation. *Microsc Res Tech* 2006; 69(6):450-8.

- Takahiro H, Kazuyo M, Kazutaka M, Masugi N, Masamitsu N, Muhtashans S, Youitiro H, Masayasu K, Kenji K, Noboru M. Ghrelin in domestic animals: distribution in stomach and its possible role. *Dom Anim Endocrinol* 2001; 21: 17–24.
- Tama E, Sean P, Nikhil M.U, Yushi B, Lauren K.R, Marc G.C and Larry S.B . G Protein and  $\beta$ -Arrestin Signaling Bias at the Ghrelin Receptor. *J Biol Chem* 2014; 289(48): 33442–33455.
- Tanaka M, Hayashida Y, Iguchi T, Nakao N, Nakai N, Nakashima K. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. *Endocrinology* 2001; 142:3697-700.
- Tang-Christensen M, Vrang N, Ortmann S, Bidlingmaier M, Horvath TL, Tschop M. Central administration of ghrelin and agouti-related protein increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats. *Endocrinology* 2004; 145: 4645-52.
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A. Minireview: Functions of the *cumulus* oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 414 – 424.
- Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 2002; 143: 717-25.
- Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis. *Vitam Horm* 2008; 77, pp. 285–290.
- Terret ME, Wassmann K, Waizenegger I, Maro B, Peters JM, Verlhac MH. The meiosis I-to-meiosis II transition in mouse oocytes requires separase activity. *Current Biology* 2003; 13: 1797–1802.

- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful cultura in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil* 1972; 30: 493 - 497.
- Thomas RE, Thompson JG, Armstrong DT, Gilchrist RB. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. *Biol Reprod* 2004; 71:1142-1149.
- Thompson NM, Gill DA, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson IC, Wells T. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 2004; 145:234-42.
- Tian PY, Fan XM. The proliferative effects of ghrelin on human gastric cancer AGS cells. *J Dig Dis* 2012; 13(9):453-8.
- Tice RR, Strauss GH. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 1995; 1: 207 – 214.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Huch A. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991; 129: 2799–2801.
- Tingen C, Kim A, Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod* 2009; 15(12):795-803.
- Tosti E. Calcium ion currents mediating oocyte maturation events. *Reprod Biol Endocrinol* 2006; 4: 26.
- Tschop M, Smiley DL and Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407:908–913.
- Tschop M, Wawarta R, Riepl RL. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: RC19-21.

- Van de Velde A, Liu L, Bols PE, Ysebaert MT & Yang X. Cell allocation and chromosomal complement of parthenogenetic and IVF bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1999; 54, 57–62.
- Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005; 63: 1717–1751.
- Van der lely AJ, Tschop M, Heiman ML and Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 2004; 25:426–457.
- Van Soom, A., Boerjan, M.L., Bols, P.E.J., Vanroose, G., Lein, A., Coryn, M. & Kruif, A.D. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after super ovulation. *Biol Reprod* 1997; **57**,1041–9.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT. Role of *cumulus* cells and serum on the *in vitro* maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biol Reprod* 1989; 40(4):720-8.
- Vanhoutte Leen. Strategies to improve *in vitro* maturation of human and mouse oocytes. Universiteit Gent 2009; ISBN 978 90 382 1420 7, 1-135.
- Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol* 2003; 162:645-54.
- Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:1013-21.



- Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y – synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002; 325:47-51.
- Wang Z, Lin P, Yu S. Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of in vitro fertilized ovine embryos. *Theriogenology* 2013; 79, 695-701.
- Waseem T, Duxbury M, Ashley SW, Robinson MK. Ghrelin promotes intestinal epithelial cell proliferation through PI3K/Akt pathway and EGFR trans-activation both converging to ERK 1/2 phosphorylation. *Peptides* 2014; 52:113-21.
- Wassarman P, Schultz R, Letourneau G, La Marca M, Bleil J. Meiotic maturation of mouse oocytes in vitro. En: Channing C, Marsh J, Sadler W Ovarian follicular an corpus luteum function. Plenum Press, New York, 1979; p.251-268.
- Watanabe N, Hunt T, Ikawa Y, Sagata. Independent inactivation of MPF and cytosstatic factor (MOS) upon fertilization on *Xenopus* eggs. *Nature* 1991; 352: 247-249.
- Watson AJ. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci* 2007; 85 (13): 1 - 3.
- Wertz-Lutz AE, Daniel JA, Clapper A, Trenkle A and Beitz DC. Prolonged, moderate nutrient restriction in beef cattle results in persistently elevated circulating ghrelin concentrations. *J Anim Sci* 2008; 86:564-75.
- Wertz-Lutz AE, Jennings JS, Clapper JA. Plasma ghrelin concentrations of beef cattle consuming a similar amount of dietary energy supplied by different ingredients. *J Anim Sci* 2010; 88(7):2289-99.
- Wertz-Lutz AE, Knight TJ, Pritchard RH, Daniel JA, Clapper JA, Smart AJ, Trenkle A and Beitz DC. Circulating ghrelin concentrations fluctuate relative to nutritional status and influence feeding behavior in cattle. *J Anim Sci* 2006; 84:3285-300.

- Whistler JL, Gerber BO, Meng EC, Baranski TJ, von Zastrow M, Bourne HR. Constitutive activation and endocytosis of the complement factor 5a receptor: evidence for multiple activated conformations of a G protein-coupled receptor. *Traffic* 2002; 3(12):866-77.
- Whitaker M, Patel R. Calcium and cell cycle control. *Development*. 1990; 108: 525 - 542.
- Whitaker M. Control of meiotic arrest. *Rev Reprod* 1996; 1:127–135
- Wickramasinghe D, Ebert KM, Albertini DF. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase. Characteristic in growing mouse oocytes. *Dev Biol* 1991; 143: 162-172.
- Wiltbank, M.C., Sartori, R., Sangsritavong, S., Lopez, H., Haughian, J.M., Fricke, PM, Gumen A. Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2001; 84 (Suppl. 1):32.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* 2007; 68 Suppl 1: S77-83.
- Xinling Ren, Qun Liu, Wen Chen, Guijin Zhu, and Hanwang Zhangcorresponding author. Effect of the site of assisted hatching on vitrified-warmed blastocyst transfer cycles: a prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(5): 691–697.
- Yamauchi J, Nagao M, Kaziyo Y, Itoh H. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of G betagamma and Galphaq/11 subunits. *J Biol Chem* 1997; 272(44):27771-7.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, and Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 2008; 132: 387\_396.

- Yang MY, Fortune JE. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol Reprod* 2008; 78(6):1153-61.
- Young JM, Mc Neilly AS. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* 2010; 140(4):489-504.
- Yudin AI, Cherr GN, Katz DF. Structure of the *cumulus* matrix and zona pellucida in the golden hamster: a new view of sperm interaction with oocyte-associated extracellular matrices. *Cell Tissue Res* 1988; 251(3): 555 - 564.
- Zelevnik AJ. Premature elevation of systemic estradiol reduces serum levels of follicle-stimulating hormone and lengthens the follicular phase of the menstrual cycle in rhesus monkeys. *Endocrinology* 1981; 2: 352 - 355.
- Zhang JV, Ren P-G, Avsian-Kretchmer O, Luo C-W, Rauch R, Klein C, Hueh A. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005; 310:996-999.
- Zhang K, Wei HX, Zhang YH, Wang SH, Li Y, Dai YP. Effects of ghrelin on in vitro development of porcine in vitro fertilized and parthenogenetic embryos. *J Reprod Dev* 2007; 53:647-53.
- Zhang W, Lei Z, Su J, Chen S. Expression of ghrelin in the porcine hypothalamo-pituitary-ovary axis during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 2008; 109:356-367.
- Zhang W, Zhao L, Lin TR, Chai B, Fan Y, Gantz I, Mulholland MW. Inhibition of adipogenesis by ghrelin. *Mol Biol Cell* 2004; 15:2484-91.
- Zhao J, Taverne MA, van der Weijden GC, Bevers MM, van den Hurk R. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol Reprod* 2001; 65: 967-977.

# **Apéndice 1**

## **TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES *IN VITRO*** **(MEDIOS Y SOLUCIONES)**

## Soluciones stock para la preparación de medios de cultivo

### Stock H (250 mM HEPES)

Hepes ácido	15,00 g
Hepes sódico	16,25 g
Rojo fenol	50 mg
Agua destilada	500 ml
pH	7,4 – 7,5
Osmolaridad	384 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada 30 días.	

### Stock 2 X TCM199

Disolver 1 sobre de TCM199 (Medio de cultivo 199) en 500 ml de H <sub>2</sub> O destilada para obtener una solución 2X y agregar:	
Sulfato de kanamicina	50 mg
Penicilina G	59 mg
Estreptomicina	100 mg
Rojo fenol	20 mg
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	

### Stock S2

NaCl	6,294 g
KCl	0,534 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,162 g
Penicilina	0,060 g
Estreptomicina	0,050 g
Agua destilada	100 ml
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada 3 meses.	

**Stock TL 10X**

NaCl	6,662 g
KCl	0,238 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,062 g
Penicilina	0,060 g
Agua destilada	100 ml
Osmolaridad (Solución 1X)	235 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada 3 meses.	

**Stock 10 X**

NaCl	4,675 g
KCl	0,230 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,045 g
Penicilina	0,060 g
Hepes ácido	1,192 g
Hepes sódico	1,302 g
Lactato de sodio	3,680 ml
Agua destilada	100 ml
pH	7,3
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada 3 meses.	

**Stock de Heparina (10 mg/ml de Heparina)**

Heparina (sulfato)	20 mg
Solución salina (0,9%) estéril	2 ml
No filtrar y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	

**Stock de Hipotaurina**

Hipotaurina	2,182 g
Agua destilada	10 ml
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	

**SPAD 100 X**

Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O	0,3080 g
ClMg.7H <sub>2</sub> O (Solución 4M)	0,0915 µl
Agua destilada	10 ml
Osmolaridad (Solución 50X)	369,15 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22µm) y guardar a 4°C. Preparar cada 3 meses.	

**H-199 (Hepes-199: TCM 199 con 15 mM de HEPES y 5 mM de Bicarbonato de sodio)**

2 X TCM199	300 ml
Hepes ácido	1,44 g
Hepes sódico	1,56 g
Bicarbonato de sodio	0,25 g
Agua destilada	600 ml
Osmolaridad	280 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada semana	

**Bi-199 (Bicarbonato 199: TCM 199 con bicarbonato)**

2X TCM199	50 ml
NaHCO <sub>3</sub>	0,2101 g
Piruvato de sodio	2,16 mg
Agua destilada	100 ml
Osmolaridad: ajustar a 280 mOsm con agua ultrapura.	
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	

**Stock ghrelina****Solución de trabajo:**

La ghrelina acilada se adquirió de Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA (Catálogo # 031-30). La presentación de la misma en estado liofilizado (100µg) se reconstituyó con

1ml de ácido acético 0.1 M para armar una “solución madre”. A partir de esta solución madre se realizaron diferentes diluciones con agua Sigma hasta obtener la “solución de Trabajo” con una concentración final de 593,13 pM. Se agregó 6,74µl, 13,48µl y 20,23µl de la “solución Trabajo” a 2 ml del medio de maduración para obtener una concentración final de 20 pM; 40 pM y 60 pM de ghrelina respectivamente.

## Medios de cultivo

### Solución Fisiológica para el mantenimiento de los ovarios

NaCl	9 g
Penicilina	59 mg
Estreptomicina	100 mg
Kanamicina	50 mg
Agua destilada	1000 ml
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C	

### **Medio de aspiración de ovocitos**

PBS (Solución buffer fosfato)	100ml
Stock de heparina	0,5 ml
SFB (Suero Fetal Bovino)	1 ml
Penicilina	5,9 mg
Estreptomicina	10 mg
Kanamicina	5 mg
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	

### **Medio de mantenimiento de ovocitos**

SFB (Suero Fetal Bovino)	10 ml
H-199	90 ml
Esterilizar por filtración (0,22µm) y guardar a 4°C. Preparar cada semana.	



**Medio para lavado de las gametas (HEPES-TALP)**

10 X TL	10 ml
NaHCO <sub>3</sub>	6, 8 mg
Stock H	6 ml
CaCl <sub>2</sub>	30 mg
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (4M)	12,3 µl
Lactato de sodio	141 µl
Piruvato de sodio	88 mg
MEM-neaas (aminoácidos no esenciales)	1 ml
BME-eaas (aminoácidos esenciales)	2 ml
ASB-FAF (libre de ácidos grasos)	300 mg
Agua destilada	100 ml
Osmolaridad	270-290 mOsm
pH 7,4	
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada 2 semanas.	

**Medio para lavado de embriones (HEPES-SOF)**

Stock S2	11 ml
NaHCO <sub>3</sub>	16,8 mg
Stock H	6 ml
Piruvato de sodio	3,6 mg
Cl <sub>2</sub> Ca	25,2 mg
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10 mg
Lactato de sodio (60%)	0,047 ml
Glucosa	10,8 mg
BME-eaas	2 ml
MEM-neaas	1 ml
ASB-FAF	300 mg
Agua destilada	100 ml
Osmolaridad	270-285 mOsm
pH 7,4	
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C Preparar cada 2 semanas	

## Medio de maduración *in vitro*

Preparar 10 ml (Volumen final) en el momento de utilizar	
Bi-199	9, 5 ml
SFB	0, 5 ml
Stock LH	10 µg (1µg/ml, Lutropin-V)
Stock FSH	1µg (100 ng/ml, Folltropin-V)

## Soluciones de Percoll para separación de espermatozoides

### SPTL 1 X

SPTL 10 X	2,5 ml
SPAD	0,2 ml
Agua estéril	17,3 ml
Osmolaridad	280-300 mOsm
pH	7,3

### PERCOLL 90%

Para 30 ml:	
Percoll	26,5 ml
SPTL 10 X	2,95 ml
SPAD 100 X	0,295 ml
NaHCO <sub>3</sub>	6,2 mg
Osmolaridad	280-300 mOsm
pH	7,3

### PERCOLL 45%

Percoll 90%	2 ml
SPTL 1 X	2 ml

## Medio para fecundación *in vitro*

(Fert-TALP, Parrish y col., 1986)

TL 10 X	5 ml
NaHCO <sub>3</sub>	0,101 mg
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	15 mg
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O (4M)	6,15 µl
Lactato de sodio	70,5 µl
Piruvato de sodio	1,44 ml
MEM-neaas	0,5 ml
BME-eaas	1 ml
ASB-FAF	300 mg
Agua destilada	50 ml
Osmolaridad	280-300 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada 2 semanas	

### *En el día de la fecundación:*

Fert-TALP	9,9 ml
Stock penicilamina	50 µl
Stock hipotaurina	50 µl
Stock heparina	10 µl

## Medio para cultivo de embriones *in vitro*

(SOFm, Tervit y col., 1972; Gardner y col., 1994)

Stock S2	2 ml
NaHCO <sub>3</sub>	42 mg

Piruvato de sodio	0,72 ml
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (4M)	2,46 µl
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5,04 mg
Lactato de sodio	9,40 µl
Glucosa*	5,4 mg
Glutamina	2,92 ml
MEM-neaas	0,2 ml
BME-eaas	0,4 ml
ASB-FAF	160 mg
Agua destilada	20 ml
pH (en atmósfera gaseada)	7,2-7,4
Osmolaridad	265-275 mOsm
Esterilizar por filtración (0,22 µm) y guardar a 4°C. Preparar cada semana	

\*La glucosa fué reemplazada por agua destilada para preparar el medio SOFm utilizado el primer día de cultivo.